

SÉRIE A, N° 1186

N° D'ORDRE :

2053

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Fernand OBATON

ASSISTANT A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

1^{re} THÈSE. — ÉVOLUTION DU MANNITOL CHEZ LES VÉGÉTAUX.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 15 mars 1929 devant la Commission d'examen.

Président : MM. MOLLIARD.

Examineurs { RABAUD.
DEREIMS.

PARIS

LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT

4 RUE DANTE 4

—
1929



ÉVOLUTION DU MANNITOL
CHEZ LES VÉGÉTAUX

A MONSIEUR LE DOYEN MOLLIARD

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE A LA SORBONNE

En respectueux et reconnaissant hommage.

SÉRIE A, N° 1186

N° D'ORDRE :

2053

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Fernand OBATON

ASSISTANT A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

1^{re} THÈSE. — ÉVOLUTION DU MANNITOL CHEZ LES VÉGÉTAUX.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 15 mars 1929 devant la Commission d'examen.

Président : MM. MOLLIARD.

Examineurs { RABAUD.
DEREIMS.

PARIS

LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT

4 RUE DANTE 4

1929

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen..... C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

Doyens honoraires.. P. APPELL, M. MOLLIARD.

Profess. honoraires.. { V. BOUSSINESQ. A. FERNBACH.
A. JOANNIS. A. LEDUC.
H. LE CHATELIER. R. DONGIER.
H. LEBESGUE. E. HEROUARD.

<i>Professeurs</i>	ÉMILE PICARD..... Analyse supér. et algèbre supérieure. G. KOENIGS..... Mécanique physique et expérimentale. E. GOURSAT..... Calcul différentiel et calcul intégral. P. JANET..... Electrotechnique générale. F. WALLERANT... Minéralogie. H. ANDOYER..... Astronomie. P. PAINLEVÉ..... Mécanique anal. et mécanique céleste. GABRIEL BERTRAND Chimie biologique. M^{me} P. CURIE..... Physique générale et radioactivité. M. CAULLERY..... Zoologie (Evolution des êtres organisés) G. URBAIN..... Chimie générale. ÉMILE BOREL..... Calcul des probabilités et phys. mathém. L. MARCHIS..... Aviation. JEAN PERRIN..... Chimie physique. RÉMY PERRIER... Zoologie (Enseignement P. C. N.). H. ABRAHAM..... Physique. M. MOLLIARD..... Physiologie végétale. E. CARTAN..... Géométrie supérieure. L. LAPICQUE..... Physiologie générale. E. VESSIOT..... Théorie des fonct. et th. des transf. A. COTTON..... Physique générale. J. DRACH..... Application de l'analyse à la géométrie. CHARLES FABRY... Physique. CHARLES PÉREZ... Zoologie. LÉON BERTRAND... Géolog. structurale et géolog. appliquée R. LESPIEAU..... Théories chimiques. E. RABAUD..... Biologie expérimentale. P. PORTIER..... Physiologie comparée. E. BLAISE..... Chimie organique. P.-A. DANGEARD... Botanique. P. MONTEL..... Mécanique rationnelle.. P. WINTREBERT... Anatomie et histologie comparées. O. DUBOSQ..... Biologie maritime. G. JULIA..... Mathématiques générales. A. MAILHE..... Etude des combustibles. L. LUTAUD..... Géogr. physique et géol. dynamique. EUGÈNE BLOCH... Physique théorique et phys. céleste. HENRI VILLAT... Mécanique des fluides et applications. CH. JACOB..... Géologie. P. PASCAL..... Chimie minérale. LÉON BRILLOUIN... Théories physiques. N..... Chimie appliquée.
---------------------------------	--



E. PECHARD... Chimie (Ens. P. C. N.). V. AUGER..... Chimie analytique. M. GUICHARD... Chimie minérale. A. GUILLET..... Physique. C. MAUGUIN... Minéralogie. L. BLARINGHEM Botanique. A. MICHEL-LÉVY Pétrographie. A. DEREIMS.... Géologie. A. DENJOY..... Calcul diff. et int. H. BENARD..... Physique (P.C.N.). E. DARMOIS.... Physique. G. BRUHAT..... Physique.	H. MOUTON..... Chimie physique. L. JOLEAUD..... Paléontologie. M. JAVILLIER... Chimie biologique. A. DUFOUR..... Physique (P. C. N.). F. PICARD..... Zoologie (Evolution des êtres organisés). ROBERT-LÉVY... Zoologie. L. DUNOYER.... Optique appliquée. A. GUILLIERMOND Botanique (P.C.N.). A. DEBIERNE... Radioactivité. M. FRECHET.... Calcul des Probabilités et Physiques math.
---	--

Secrétaire..... DANIEL TOMBECK.

EVOLUTION DE LA MANNITE

(MANNITOL) CHEZ LES VÉGÉTAUX

INTRODUCTION

La découverte des polyols (1) remonte au début du XIX^e siècle. Depuis lors, on a signalé leur présence dans un grand nombre de végétaux. Cependant l'intérêt qu'ils ont soulevé dans le monde scientifique est loin d'être comparable à celui qu'a suscité l'étude des autres glucides. Il s'agit, en effet, de substances qui n'ont pas une grande importance au point de vue économique.

Parmi les alcools polyatomiques, nous nous occuperons spécialement du mannitol qui est l'un des plus répandus. On le trouve aussi bien chez les champignons que chez les algues et les plantes supérieures. BOURQUELOT est le premier qui ait étudié le polyol, au point de vue physiologique, chez les champignons. Cependant ses recherches ne purent être poussées très loin, parce qu'il ne possédait pas de méthode de dosage sensible. D'autres auteurs ont été arrêtés par la même difficulté. A l'heure actuelle, on ne connaît encore ni l'origine, ni le devenir de cette substance. Les traités généraux de Physiologie Végétale indiquent des méthodes qui permettent de la déceler chez

(1) Dans la rédaction de ce Mémoire nous avons adopté la nouvelle terminologie de Chimie Biologique dont les principes ont été posés dans les différents congrès qui se sont réunis à cet effet, et résumés par BRIDEL dans *La réforme de la Nomenclature de Chimie Biologique. Etat de la question à la fin de 1926*. Masson, Paris.

En particulier, d'après les indications de l'auteur, il nous a semblé logique d'appeler mannitol, la substance antérieurement connue sous le nom de mannite.

un certain nombre de plantes : mais les indications concernant son évolution sont presque inexistantes. ABDERHALDEN [1] pense qu'elle est formée par l'assimilation chlorophyllienne. Cependant comme il ne donne aucune référence bibliographique à ce sujet, il est probable qu'il s'agit là d'une idée personnelle, qui n'est appuyée sur aucune expérience. Nous nous proposons donc d'essayer de combler cette lacune en étudiant l'évolution du mannitol dans deux plantes très différentes telles que le *Sterigmatocystis nigra* Van Tieghem et le Céleri, *Apium graveolens* L. Nous chercherons à mettre en évidence l'origine de cette substance et les rapports qu'elle présente avec les autres glucides dont l'étude physiologique a déjà été faite. De ces observations nous déduirons des hypothèses que nous nous efforcerons de vérifier par des expériences. En rassemblant les faits acquis, nous tirerons des conclusions générales, valables pour l'Ascomycète et pour l'Ombellifère.

Nous espérons que cette étude qui nous a été confiée par M. le Doyen MOLLIARD, pourra servir de base aux chercheurs qui voudront édifier le chapitre, actuellement très restreint, des alcools polyatomiques.

Au début de ce mémoire, je tiens à rappeler le souvenir de GASTON BONNIER sous la direction duquel j'ai fait mes premières recherches de Botanique.

Que M. le Professeur MOLLIARD, mon maître en Physiologie végétale, à qui je dédie ce travail, trouve ici toute l'expression de ma respectueuse reconnaissance, pour l'aide scientifique et matérielle qu'il n'a cessé de me prodiguer depuis mon entrée dans son laboratoire.

J'adresse tous mes remerciements à M. le Professeur GUILLIERMOND, qui s'est toujours vivement intéressé à mes expériences et dont le concours m'a été si précieux pour leur réalisation.

M. le Professeur BOIS m'a permis d'utiliser les terrains de culture du Muséum ; qu'il soit assuré de ma gratitude.

J'ai toujours rencontré un excellent accueil auprès de M. DUFOUR, ancien Directeur-adjoint du laboratoire de Biologie végétale de Fontainebleau, et de son successeur, M. MICHEL-DURAND.

M. DAUPHINÉ, Chef des Travaux Pratiques de Botanique du P. C. N. a mis à ma disposition le matériel de son laboratoire. Je lui adresse mes remerciements.

M. Jacques LÉVÊQUE DE VILMORIN a fait entreprendre gracieusement à mon intention des cultures de Céleri dans ses champs d'expériences. Je l'en remercie bien vivement.

Je témoigne ici toute ma reconnaissance à mon Père, dont le dévouement a rendu facile l'étude sans interruption de l'une des plantes qui figurent dans ce travail.

Je n'ai garde d'oublier tous mes amis et collègues dont l'aide m'a été si utile.

Je dois des remerciements particuliers au Conseil technique de la Caisse des Recherches scientifiques qui m'a accordé, à plusieurs reprises, des subventions pour mes recherches, et au Conseil de la Faculté des Sciences qui m'a attribué une bourse Commercay.

HISTORIQUE

En 1806 PROUST [40] a mis en évidence le mannitol dans la manne du Frêne. Par la suite on l'a retrouvé dans beaucoup de végétaux. Notre intention n'est pas de dresser ici un catalogue des plantes contenant le polyol. On trouvera de telles listes dans les tables des différents périodiques, *Annales de Chimie et de Physique*, *Journal de Pharmacie et de Chimie*, *Repertorium für die Pharmacie*, *Bulletin de la Société Mycologique de France*, pour ne citer que les principaux. Cependant ces listes sont encore très incomplètes et BOURQUELOT a montré qu'il y a encore beaucoup à faire dans ce domaine de la statistique du mannitol.

La découverte du polyol ayant été faite chez une plante supérieure, bientôt après en 1811, BRACONNOT [13] signale la présence de sucre chez les champignons. Il décrit ainsi le corps qu'il a obtenu : « Ce sucre se présente sous la forme de cristaux aciculaires disposés en cercle rayonnant, lorsqu'il est obtenu par évaporation lente de la solution alcoolique, ou d'aiguilles soyeuses fines, quand la cristallisation est rapide ». Il est bien évident que la substance qui cristallise dans ces conditions est du mannitol. Cependant l'auteur n'identifie pas le polyol de PROUST et son « sucre de champignons ». VAUQUELIN [42] qui s'est à son tour occupé de la question, pense à une assimilation possible des deux substances mais n'ose cependant pas conclure parce que, d'après BRACONNOT, le corps qu'il a préparé est capable de fermenter alors que le mannitol est fermentescible. D'autres travaux sont publiés après 1813, mais il faut arriver en 1836, époque à laquelle LIÉBIG et PELOUZE [23] font paraître leur mémoire, pour que l'on sache que le sucre de BRACONNOT est identique au polyol de PROUST. Toute une série de recherches viennent confirmer les résultats des deux auteurs. Seulement la question de la fermentation restait obscure. En 1838 MITSCHERLICH [29] s'intéressant au sucre de

l'ergot de seigle, montre qu'il existe une autre substance chez les champignons : le mycose, qui possède un pouvoir rotatoire élevé, $+ 173^{\circ}2$. Sa solution aqueuse présente la fermentation alcoolique. Par hydrolyse, il donne du réducteur que l'auteur croit être du glucose. Fait curieux, dans d'autres échantillons d'ergot de seigle, il ne trouve que du mannitol et pas de mycose. A partir de 1873, les recherches de MÜNTZ [35-36-37] montrent que le mycose de MITSCHERLICH est identique au corps que BERTHELOT avait décrit en 1859 sous le nom de tréhalose. A cette époque, la question des matières sucrées chez les champignons est donc arrivée à ce point : dans certaines espèces il y a du mannitol, dans d'autres, du tréhalose, dans une troisième série, on trouve un mélange des deux corps. Il ne reste plus qu'un point obscur, c'est que tantôt on décèle du tréhalose et tantôt du mannitol dans deux échantillons différents de la même espèce.

C'est à BOURQUELOT que revient l'honneur d'avoir résolu cette question. Il a d'abord complété la liste [5] des champignons chez lesquels il y a du mannitol. Puis il a surtout étudié l'évolution du polyol et du tréhalose chez un certain nombre d'espèces de champignons. Il s'est d'abord efforcé de montrer que le mode de fixation des échantillons avait une influence sur le rendement en glucides. Dans une note [4] parue dans le *Journal de Pharmacie et de Chimie* de 1889, il indique qu'un champignon, fixé immédiatement après la récolte, contient du tréhalose, et qu'après dessiccation lente, le mannitol l'a remplacé. Il assimile cette disparition à un phénomène de maturation. L'année suivante, dans le même périodique [7], il étudie la nature et les proportions des matières sucrées contenues dans les champignons à différents âges. De ces expériences, il résulte qu'un grand nombre de *Boletus* renferment quand ils sont jeunes, exclusivement du tréhalose et quand ils sont plus âgés, soit du mannitol seul, soit un mélange de polyol et de tréhalose. *Boletus edulis* ne contiendrait, même lorsqu'il est très vieux, que du tréhalose. « Il paraît résulter de cet ensemble de résultats que la disparition du tréhalose est réellement liée à la maturation du champignon, c'est-à-dire à la formation des spores. Il est vraisemblable en outre que la mannite qui lui

succède dans la plupart des cas ne tarde pas à disparaître à son tour ». Il étudie ensuite [8] la répartition des matières sucrées dans le Cèpe comestible et le Cèpe orangé : les glucides sont surtout abondants dans le pied, moins abondants dans le chapeau et absents dans l'hyménium. « Le pied est évidemment un organe dans lequel s'accumulent les matières sucrées de réserve qui doivent servir à la formation des spores, et l'hyménophore est l'organe dans lequel ces matières sont consommées au moment de cette formation. Il y a là un ensemble de phénomènes physiologiques très comparable à ce qu'on observe dans la Betterave. Le sucre de canne s'accumule en effet dans la Betterave pendant la première période de la végétation, et, pendant la seconde, il est transformé en sucre interverti, lequel est consommé dans les rameaux porteurs de graines ». L'auteur montre ainsi l'importance générale des alcools polyatomiques en physiologie végétale et cette dernière citation devait pousser les chercheurs à faire des rapprochements entre l'évolution des polyols des champignons et des plantes supérieures. BOURQUELOT était même plus audacieux puisqu'il comparait le mannitol au saccharose. Mais l'étude de ces champignons à chapeau est délicate pour plusieurs raisons. La première difficulté provient de la méthode de dosage employée. Dans une note citée antérieurement [8] et dans une autre de la même année [9], il indique son mode opératoire. Il fait un épuisement par l'alcool à 90° bouillant, il distille la solution alcoolique et évapore le liquide restant au dixième du poids de la matière traitée. Puis il précipite le résidu par l'alcool à 90°. Il filtre après repos et évapore le filtrat jusqu'à consistance sirupeuse. « Le tréhalose et la mannite, qui sont les seules substances sucrées cristallisables dans ces conditions, ne tardent pas à cristalliser et, lorsqu'on juge la cristallisation complètement effectuée, il n'y a plus qu'à essorer les cristaux à la trompe, à les laver avec un peu d'alcool à 90°, à les dessécher et à les peser ». Nous avons nous-même opéré de cette façon pour isoler du mannitol et du tréhalose. Mais nous avons remarqué que, dans le cas où les substances à rechercher sont peu abondantes, il est difficile d'obtenir leur cristallisation. L'auteur était donc amené à opérer sur des poids considérables de champi-

gnous, de l'ordre de plusieurs kilogrammes. Or pendant le temps de la récolte de ces grosses quantités, les substances se transformaient, comme ill'a montré lui-même. Une seconde difficulté provient de l'irrégularité de la poussée des champignons et du peu de connaissances que nous avons sur leur mode de vie. Il y a des années [6] où les chapeaux de certaines espèces se montraient plus riches en mannitol et d'autres où le tréhalose dominait, alors que l'âge, d'ailleurs inconnu, des individus semblait approximativement le même. Ces raisons ont conduit l'auteur à préciser ses expériences en s'adressant au *Sterigmato-cystis nigra* qu'on appelait, à cette époque, *Aspergillus niger*. Dans une note parue aux *Comptes rendus de l'association française pour l'avancement des sciences* [10], il signale que la moisissure cultivée à 30° sur milieu de RAULIN, et qui, dans ces conditions, met quatre jours à arriver à maturité, contient du mannitol pendant toute sa vie, mais ne renferme du tréhalose qu'à partir du moment où les fructifications commencent à se montrer, c'est-à-dire à partir du troisième jour. Ce dernier sucre a d'ailleurs disparu au bout de quatre jours. Il donne, à ce propos, le tableau suivant dans une autre note [11].

	Tréhalose p. 1.000	Mannite p. 1.000
Culture de 48 H.	0	6,6
— 68 H.	4,4	9,1
— 96 H.	0	10,5

Nous avons montré [38] que cette brusque apparition du tréhalose, suivie d'une utilisation non moins soudaine, provenait vraisemblablement de la méthode de dosage par cristallisation qui ne permet de déceler le corps que lorsqu'il se trouve dans le mycélium en quantité suffisamment importante. Au contraire, en dosant cette substance au polarimètre, on voit que l'évolution est très progressive. D'autre part, dans les chapitres ultérieurs, on se rendra compte que nous ne sommes pas d'accord avec BOURQUELOT sur l'augmentation régulière du mannitol dans le mycélium. Pour nous, ce corps disparaît du champignon à peu près proportionnellement au temps à partir de 48 heures. Dans une dernière note parue en 1904, BOURQUELOT et HÉRISSEY [12] font un rapprochement qui nous paraît intéres-

sant d'une part entre le saccharose et les plantes vertes, d'autre part entre le tréhalose et les plantes sans chlorophylle. Depuis lors la question de l'évolution des glucides chez les champignons a été peu travaillée et aucun fait nouveau important n'a été acquis.

Au contraire, au point de vue de l'utilisation du mannitol, on a fait un certain nombre de nouvelles recherches. Les bactériologistes ont étudié l'influence du polyol sur toutes les bactéries. Ils en ont tiré des conclusions pour la classification de ces végétaux inférieurs. Mais ce domaine est trop éloigné du nôtre pour que nous analysions ici les nombreux travaux qui ont été faits sur ce sujet. Nous nous arrêterons donc uniquement aux mémoires ayant trait au *Sterigmatocystis* ou aux champignons voisins. CZAPECK [19], en 1902, fournissant, comme source d'azote à l'*Aspergillus niger*, 1 p. 100 d'asparagine, trouve qu'en présence de mannitol, le rendement, au bout de 21 jours de culture, est de 416 contre 477 en présence de glucose. GOUIN [18] cultive le *Sterigmatocystis* dans un liquide de RAULIN sans fer, ni zinc, ni silicium et contenant 7 grammes de saccharose par 300 centimètres cubes de liquide dans lequel il introduit différents alcools polyatomiques au bout d'une semaine de végétation. Dans ces conditions expérimentales, il trouve que le mannitol est un aliment, puisque la culture sur cette substance pèse plus que sur la solution mère. MOLLIARD [33] recherchant l'influence des milieux faiblement minéralisés sur le comportement du *Sterigmatocystis* en fonction de différentes substances sucrées, montre que la quantité d'acides organiques produits en présence de mannitol est faible (0 cm³ 15) par rapport à celle qui se forme dans un milieu contenant du sucre (36 cm³ 5). COLIN [17] s'adresse à la seconde substance que nous avons suivie nous-même chez la moisissure, le tréhalose. Etudiant l'hydrolyse de quelques polysaccharides et en particulier du tréhalose, par le *Botrytis cinerea*, il montre que le champignon consomme avec une extrême lenteur ce sucre. Le milieu ne renfermant jamais de glucose, c'est la preuve de l'absence rigoureuse dans le liquide d'un enzyme hydrolysant cette substance.

Au point de vue de l'évolution du mannitol et du tréhalose

dans le *Sterigmatocystis nigra*, nos connaissances actuelles peuvent se résumer de la façon suivante. Il y a, dans le mycélium, du tréhalose et du mannitol. D'après BOURQUELOT, le tréhalose apparaît brusquement et disparaît avec la même rapidité au moment de la formation des spores. Le *Sterigmatocystis* ressemblerait en ceci aux champignons à chapeau, chez lesquels on trouve du tréhalose quand ils sont jeunes. Le mannitol va en augmentant à mesure que la culture vieillit. Chez les champignons plus élevés en organisation, le polyol remplace de même le tréhalose quand ils sont âgés ou quand on les a laissés se dessécher lentement.

Résumons maintenant l'état de nos connaissances physiologiques sur le mannitol dans les plantes supérieures. De très bonne heure, on a reconnu la présence du polyol dans le Céleri. HÜBNER et VOGEL [21] ont signalé en 1823 que la racine de Céleri en renfermait. VOGEL [45] retrouve ce corps dans les feuilles de la même plante. En 1833 PAYEN [39] reprend la question. Il extrait le polyol de la racine de Céleri-rave et il propose ce mode de préparation aux pharmaciens, qui sont les plus directement intéressés par le polyol, parce que celui-ci rentre dans certaines de leurs potions. Cependant le rendement étant un facteur important au point de vue commercial, PAYEN se propose de rechercher dans quelles conditions culturales on obtient le plus de produit, et, par là même, la question est portée sur le terrain expérimental. Cependant il faut arriver en 1861 pour que des recherches ayant nettement un caractère physiologique soient de nouveau entreprises. DE LUCA [24] met en évidence le mannitol dans les olives. Le polyol se trouve dans toutes les parties de la plante et l'extraction en est très facile. En effet, dans des bocaux contenant des feuilles d'Olivier conservées dans l'alcool, en vue de constituer un matériel d'études anatomiques, nous avons vu celles-ci se couvrir de cristaux blancs agglomérés en petites sphères, forme sous laquelle se présente le mannitol lors de sa première cristallisation. D'après DE LUCA « cette mannite paraît essentielle à la formation de la matière grasse ; mais, avant de se prononcer définitivement sur cette importante question de physiologie végétale, il est nécessaire de faire d'autres essais et de doser

cette matière sucrée aux différentes époques de la végétation et dans les différents organes de l'Olivier ». L'année suivante, l'auteur publie [25] le résultat des dosages qu'il s'était proposé de faire. Le polyol est abondant dans les fleurs de l'Olivier, par contre les fleurs fécondées et tombées sur le sol n'en contiennent pas. Les petites olives à peine formées en sont riches. Tant qu'elles sont vertes, elles en renferment. Le polyol diminue dans la seconde partie de leur développement. « La chlorophylle ou matière verte analogue qu'on rencontre en abondance dans les feuilles et dans les olives, accompagne toujours la mannite et disparaît avec elle, de manière que les feuilles jaunes et les olives mûres ne contiennent ni chlorophylle ni mannite ». Voilà un rapprochement entre le polyol et la chlorophylle qui n'est pas fortuit dans l'esprit de l'auteur. Cependant celui-ci ne pousse pas plus avant l'étude de l'origine du mannitol car il s'intéresse surtout à la formation de l'huile. En 1897 GERBER [20] reprend la question de la transformation du mannitol en huile dans les olives et montre, en établissant le quotient respiratoire, que l'hypothèse de DE LUCA est exacte. Nous ne voulons pas entrer plus avant dans cette question qui sort nettement de notre sujet, et nous ne faisons pas nôtre l'hypothèse de DE LUCA. Nous voulons simplement faire remarquer, dans ces recherches, d'une part, les rapprochements intéressants qui sont faits entre le mannitol et les organes contenant de la chlorophylle, et, d'autre part, la mise en évidence d'une évolution du polyol dans la plante supérieure.

Nous pouvons donc résumer de la façon suivante l'état de nos connaissances physiologiques sur l'évolution du mannitol chez les Végétaux. Chez les champignons, il est très répandu et il existe souvent à côté d'un holo-glucoside, le tréhalose. Dans certaines espèces, mannitol et tréhalose peuvent se remplacer suivant l'âge de l'individu : le sucre, dans ce cas, apparaissant le premier. Dans d'autres cas, il n'y a jamais coexistence des deux produits. Chez le *Sterigmatocystis nigra*, il semble que le polyol s'accumule de plus en plus à mesure que la culture vieillit. Cependant BOURQUELOT pense que cette substance doit disparaître à son tour.

Chez les plantes supérieures, deux points seulement ont été

mis en évidence : d'une part, la présence du polyol dans les différentes parties de quelques plantes ; d'autre part, la relation entre les organes chlorophylliens et le mannitol : chlorophylle et polyol disparaissant ensemble des feuilles.

RECHERCHES SUR L'ÉVOLUTION DU MANNITOL DANS LE *STERIGMATOCYSTIS NIGRA* VAN TIEGHEM

Au cours de ce mémoire, nous nous proposons d'étudier l'évolution du mannitol chez les végétaux en rapport avec les principaux sucres qu'ils peuvent contenir. Cette étude nous amènera à rechercher, par l'expérience, à quels facteurs sont imputables les variations naturelles observées. Il nous faudra nous adresser à des plantes qu'il est facile de suivre pendant toute leur végétation et qui se prêtent, sans trop en souffrir, aux expériences auxquelles nous voulons les soumettre. Parmi tous les végétaux qui renferment du mannitol, le *Sterigmatocystis nigra* est l'un des plus intéressants, par la facilité avec laquelle on peut le cultiver à l'état de pureté et par la rapidité de sa croissance. D'autre part le fait, signalé par BOURQUELOT [11] de la variation de la teneur en mannitol du mycélium suivant l'âge de la culture, nous permet de penser que le champignon conviendra pour les recherches que nous voulons entreprendre.

I. Méthodes de culture.

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, il nous paraît utile de préciser les conditions de vie de cette moisissure et la méthode qui permet de la cultiver.

Les recherches classiques de RAULIN, publiées en 1870 et intitulées : *Etudes chimiques sur la végétation* [41] ont attiré l'attention sur le *Sterigmatocystis nigra* que l'on appelait à ce moment *Aspergillus niger*. VAN TIEGHEM, en révisant le genre *Aspergillus*, a créé le genre *Sterigmatocystis* qui ne diffère du précédent que par la présence de rameaux qui se ramifient à leur tour au sommet et se terminent par un verticille de ramuscules portant un chapelet de spores. RAULIN a indiqué la façon dont on peut obtenir des spores. « Lorsqu'on ne possède point

encore d'*Aspergillus*, il suffit, pour se procurer ce végétal à l'état pur, d'abandonner à l'étuve certaines substances naturelles, telles que de l'eau de levure acidulée, du pain humide, des tranches de citron, une dissolution de tannin, ou encore la dissolution artificielle indiquée précédemment (dite solution de RAULIN). Les spores d'*Aspergillus* qui se trouvent au nombre des germes de l'atmosphère peuvent tomber sur ces matières et s'y développer pêle-mêle avec d'autres organismes. Lorsqu'on voit apparaître l'*Aspergillus*, qui se distingue tout d'abord par ses fructifications noires, on le sème à nouveau sur un liquide artificiel et l'on finit par l'obtenir exempt de mélange ». VAN TIEGHEM a obtenu cette moisissure à partir de noix de galle. Nous avons eu nous-même l'occasion de vérifier que la poudre de noix de galle malaxée avec de l'eau et abandonnée dans une assiette loin du laboratoire où l'on cultive habituellement le *Sterigmatocystis*, se couvre en quelques jours de fructifications noires qui permettent d'ensemencer des tubes de culture. L'examen microscopique montre que la moisissure qui se développe est bien le *Sterigmatocystis nigra*. Pour nos cultures, nous avons utilisé la souche mise à notre disposition par M. le Professeur MOLLIARD.

L'ensemencement des tubes de carotte et de pomme de terre est fait en prenant les précautions habituelles d'asepsie. Portés à l'étuve à 34° ces tubes, au bout de 24 heures, montrent un début de développement du mycélium qui apparaît sous forme de filaments blancs. Après deux ou trois jours, le mycélium est déjà bien fructifié. Il continue cependant à se développer et, après 15 jours, la quantité de conidies est suffisante pour permettre d'ensemencer largement des flacons de culture. Les fioles utilisées pour cet usage sont celles d'ERLENMEYER, d'un litre de capacité. On introduit 150 centimètres cubes de liquide dans chaque flacon que l'on bouche ensuite avec un tampon de coton cardé et on stérilise à l'autoclave à 120° en prenant des précautions contre l'humidification du coton. Après refroidissement, onensemence très largement de façon que la quantité de conidies introduites soit toujours supérieure à celle qui est nécessaire pour couvrir le liquide d'une façon homogène dès les premières heures de la germination. En principe, après

24 heures d'étuve, le voile mycélien doit être complet dans toutes les fioles:

Ces données générales étant posées, il convient de faire remarquer un certain nombre de causes d'erreur susceptibles de provoquer des différences individuelles entre deux flacons provenant d'une même série de cultures.

D'abord il est important d'utiliser toujours les mêmes fioles car la surface offerte au mycélium joue un rôle dans le rendement en poids sec de celui-ci. Nous avons vérifié que deux mycéliums cultivés sur 150 centimètres cubes de liquide, dans les mêmes conditions, la surface seule du flacon variant de 126 centimètres carrés à 138 centimètres carrés, présentaient des poids secs respectifs moyens de 0 gr. 817 contre 0 gr. 500 au bout de 46 heures d'étuve à 34°. Dans notre expérience, la quantité de liquide restant constante, la profondeur varie en sens inverse de la surface, et c'est peut-être en tenant compte de la profondeur qu'on peut expliquer ces différences de poids. Cette expérience nous montre qu'il est à peu près impossible d'obtenir deux mycéliums identiques dans deux fioles différentes, car celles-ci ne sont jamais absolument semblables. Il faut donc faire porter les analyses sur un certain nombre de cultures, effectuées dans les mêmes flacons. De cette façon une série sera toujours comparable à la suivante.

Une autre cause d'erreur peut intervenir. Il s'agit des trous qui se produisent dans la toile mycélienne et dont RAULIN a signalé l'importance. Il rapportait ce phénomène aux mouvements imprimés aux spores par les courants d'air et au « phénomène d'attraction capillaire de petites sphères flottant à la surface d'un liquide ». Or nous avons également obtenu parfois des solutions de continuité dans les mycéliums de nos cultures, qui nous les ont fait écarter, et cependant le rôle des courants d'air n'est pas admissible puisque nous nous servons de fioles hautes, bouchées au coton et placées dans une étuve fermée. La production de trous dans la toile mycélienne doit être attribuée à la direction que prennent les filaments dès leur germination. Dans certains cas ils s'intriquent les uns dans les autres et dans d'autres ils restent en cordons compacts qui ne peuvent plus se pénétrer, ce qui détermine des solutions de continuité.

Cet accident se produit surtout dans les cultures sur chlorhydrate d'ammoniaque, qui, comme nous le verrons, demeurent fortement acides.

Les cultures peuvent encore présenter d'autres variations dans leur développement, notamment dans le temps mis par les mycéliums à fructifier. Normalement, sur le milieu au chlorhydrate d'ammoniaque et au saccharose, on voit apparaître les premières conidies entre 64 et 72 heures. Certains flacons présentent un retard manifeste. Si on analyse les liquides d'une série dans laquelle ces accidents se produisent, on remarque d'abord que la vitesse d'utilisation du sucre est à peu près la même dans tous les cas. Ce qui varie surtout, c'est la quantité d'acide formé.

Dans ce tableau sont résumées quelques observations ayant trait à une série non homogène au point de vue de la fructification.

Age de la culture	Poids sec du mycélium	Acide formé par flacon en potasse, solution décimorale	Sucre restant dosé en sucre inverti
	gr.	cm ³	gr.
24 heures (1)	0,869	51	4,97
49 — (2)	2,630	68	1,16
72 — (3)	2,844	37	0,01
97 — (4)	2,218	12	0,01
97 — (5)	2,659	51	0,01
120 — (6)	2,244	36	0,01

La culture n° 3 considérée à 72 heures commence à fructifier. A 97 heures le mycélium n° 4 qui était semblable au n° 3 à 72 heures, est totalement couvert de conidies noires, tandis que le n° 5 au bout du même temps, ne présente encore que quelques rares spores sur les bords du mycélium. Or nous voyons que, dans les liquides 2, 3 et 4, depuis 49 heures, l'acidité diminue et qu'elle est très faible au moment où la fructification est complète, à 97 heures. Au contraire elle présente encore une valeur élevée dans le n° 5 où la sporulation débute seulement. Le poids du mycélium présente des variations également inté-

ressantes : il augmente jusqu'à 72 heures puis diminue de 72 à 97 heures. Dans la culture anormale, il est plus élevé que dans le n° 4 qui représente l'évolution normale du *Sterigmatocystis*. Donc à des différences d'aspect au moment de la sporulation correspondent des acidités variables, des liquides, et des poids de mycélium assez dissemblables entre eux. Il faut donc choisir les cultures qui sporulent entre 64 et 72 heures, à la température de 34°, sur milieu à l'azotate d'ammoniaque et au saccharose.

Le départ entre une culture normale et une anormale est donc facile à faire d'après l'aspect extérieur, à partir de 64 heures. Avant ce temps on possède un autre point de repère qui permet de caractériser l'état des mycéliums : c'est la germination. Dans ces mêmes conditions, elle se produit à 16 heures et le liquide est complètement couvert à 24 heures. Si des trous subsistent dans le mycélium vers 32 heures, la culture est à écarter. Par ailleurs, l'étude du poids sec et de l'acidité montre que jusqu'au moment où la fructification va se produire, les différences individuelles sont très faibles. Elles ne se manifestent qu'à partir du moment où l'acidité commence à décroître. Tout se passe comme si certains mycéliums utilisaient facilement l'acide formé, tandis que d'autres continuaient beaucoup plus longtemps à réagir contre l'alcalinité du milieu en formant des acides, qui, en définitive, retardent ou empêchent la fructification. MOLLIARD a, en effet, formulé ainsi la loi de la formation de l'acide par le *Sterigmatocystis* [34] : « La formation de l'acide oxalique résulte d'une réaction des cellules végétales vis-à-vis d'une tendance à l'alcalinité du milieu nutritif ».

En résumé, pour se tenir à l'abri des causes d'erreur créées soit par les conditions externes, soit par des variations internes du mycélium, il faut et il suffit de procéder à des cultures en série, faites dans les mêmes flacons, avec des liquides préparés à partir de flacons de réserve (méthode MOLLIARD). Il faut ensuite ensemençer largement avec des spores bien pulvérisées, surveiller la germination des conidies et rejeter toutes les cultures dans lesquelles se produisent des solutions de continuité et toutes celles dont la fructification ne débute pas entre 64 et 72 heures.

II. Méthodes de dosage. Divisions du sujet.

On cultive, par la méthode que nous venons d'exposer, six ou douze mycéliums à la température de 34°. Les analyses sont faites sur la totalité des flacons dans lesquels la croissance est régulière. Au moment de la récolte, on rassemble tous les liquides ; on lave chaque champignon avec une quantité connue d'eau distillée qu'on réunit au liquide précédent et on exprime les toiles mycéliennes. Dans ces conditions, on obtient, d'une part, la totalité des liquides de culture, additionnés des eaux de lavage et, d'autre part, l'ensemble des mycéliums. Les analyses portent sur chacune de ces parties.

Dans le milieu de culture, nous avons dosé l'acide formé et le sucre restant. L'acidité a été mesurée sous forme d'acide libre neutralisable par la potasse en présence de la phtaléine du phénol. Le dosage est fait en général sur 20 centimètres cubes et le résultat est rapporté à la totalité du liquide contenu dans un flacon. Le dosage du sucre restant est effectué par la méthode de BERTRAND : les nombres que nous donnons correspondent donc au sucre exprimé en réducteur. Pour connaître la quantité de sucre non encore hydrolysé au début de la végétation, on procède à deux essais, l'un sur le liquide tel qu'il est recueilli, et l'autre après hydrolyse par la sucrase, à l'étuve.

Dans les mycéliums nous avons dosé le mannitol et le tréhalose. Nous avons recherché les sucres réducteurs et nous avons établi le poids sec du mycélium.

Le poids sec est obtenu de la façon suivante : après avoir exprimé à la main le liquide retenu dans les toiles mycéliennes, nous pesons l'ensemble des mycéliums au décigramme près. Puis nous prélevons au milieu de la masse des champignons, une tranche du poids de deux ou trois grammes que nous pesons sans retard dans un flacon à tare bouché à l'émeri. Ce fragment témoin est desséché à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant. Le rapport entre le poids frais total et d'autre part entre le poids frais et le poids sec de l'échantillon nous donne le poids sec de l'ensemble des mycéliums, et, partant, celui d'un seul. Ce procédé de mesure du poids sec est en accord avec l'ensemble de notre méthode, qui, pour les raisons que

nous avons invoquées dans le chapitre précédent, utilise toujours un certain nombre de mycéliums de façon à obtenir des résultats moyens comparables entre eux.

Le dosage des sucres et du polyol est précédé de l'extraction de ces substances par la méthode générale, valable pour les sucres. Les mycéliums sont fixés par l'alcool à 95° bouillant, au bain-marie, sous réfrigérant ascendant. Au bout de vingt minutes d'ébullition, alcool et mycélium sont jetés sur une toile filtrante : l'alcool est exprimé et le mycélium est broyé à la machine. Devenu très cassant par suite de sa déshydratation par l'alcool fort, celui-ci se laisse facilement réduire en poudre. Cette poudre est mise en présence d'alcool à 80° et épuisée trois fois par une certaine quantité d'alcool, au bain-marie, dans les mêmes conditions que précédemment. Au total, la quantité d'alcool utilisée pour 70 à 80 grammes de poids frais de substance est environ d'un litre à un litre et demi. Finalement tous les liquides sont rassemblés et distillés sur le vide, au bain-marie. Quand il ne reste plus qu'une masse pâteuse au fond du ballon, on reprend par l'eau distillée et on rince le ballon. La défécation est effectuée par le sous-acétate de plomb. On filtre sur filtre plat et sur le vide, on remet le précipité en suspension dans l'eau distillée et on filtre à nouveau. L'excès de plomb est éliminé par le carbonate de soude. Après filtration et lavage du précipité, on obtient un liquide qui renferme la totalité des sucres existant dans les mycéliums.

BOURQUELOT a prouvé, ainsi que nous l'avons vu, l'existence, dans le *Sterigmatocystis*, du mannitol et du tréhalose. Nous avons nous-même extrait ces deux corps et vérifié leur identité. Par cristallisation, nous avons obtenu des aiguilles blanches de goût sucré, qui ont présenté au bloc MAQUENNE, un point de fusion de 164°5 alors que le mannitol pur du commerce nous a donné 165°. Le pouvoir rotatoire spécifique en présence d'acide arsénieux a été trouvé égal à 46°88. Le tréhalose que nous avons isolé correspond au corps que MAQUENNE [26] décrit sous ce nom. Les cristaux se sont présentés comme des octaèdres durs et brillants, possédant une saveur sucrée. Le point de fusion n'est pas facile à définir car il n'est pas net, comme dans le cas du mannitol. Mais ce qui caractérise suffisamment ce corps,

c'est la grandeur exceptionnelle de son pouvoir rotatoire qui, pour le corps anhydre, est $[\alpha]_D = +197^{\circ}3$ et pour le corps hydraté $[\alpha]_D = +176^{\circ}3$. Nous avons utilisé cette propriété du tréhalose pour le doser. Jusqu'à présent on n'a pas trouvé, dans le jus du mycélium, d'autre substance présentant un pouvoir rotatoire et en quantité suffisante pour venir fausser les dosages du tréhalose par voie optique. Pour connaître la quantité de substance contenue dans 100 centimètres cubes de liquide, en fonction du pouvoir rotatoire, on applique la formule générale

$$p = \frac{x \times 100}{l \times [\alpha]_D}$$

x étant la déviation trouvée et l la longueur du tube. $[\alpha]_D$ a été considéré comme égal à $176^{\circ}3$, parce qu'il nous a semblé logique de doser le tréhalose en solution dans l'eau en tant que corps hydraté. Le tube que nous employons étant celui de 3 décimètres, il ne reste qu'à multiplier la déviation trouvée par 0,113 pour avoir la quantité de corps contenue dans 100 centimètres cubes de liquide.

Le jus du mycélium ne présente jamais, dans les conditions où nous avons opéré, de pouvoir réducteur mesurable.

Le dosage du mannitol peut être fait de différentes façons. La technique la plus simple consiste à procéder par cristallisation et à peser les cristaux obtenus. C'est de cette façon que l'on dose le polyol dans les vins mannitolés [22]. Mais ce mode opératoire, en dehors de sa lenteur, présente certains inconvénients : le rendement de la cristallisation n'est pas établi une fois pour toutes et, suivant les circonstances, il peut varier. Il permet donc d'indiquer approximativement la teneur en polyol d'un organe, mais il est tout à fait insuffisant quand il s'agit de mesurer des variations faibles de cette substance à deux moments rapprochés de la végétation.

Nous avons essayé une méthode due à MEUNIER [27-28] qui consiste à former un acétal benzoïque. Ce corps est insoluble dans l'eau et il suffit de le recueillir sur un filtre, de le laver et de le faire sécher pour connaître la quantité de mannitol contenue dans une liqueur. On peut même le régénérer de son acétal. Mais la réaction est fonction du temps. Il faudrait faire

un dosage chronométré, dans lequel une différence de quelques secondes peut amener des perturbations importantes. Nous ne pouvons donc utiliser cette propriété intéressante des alcools polyatomiques pour nos recherches.

D'autres méthodes ont également été proposées. STÖCKLIN et VULQUIN oxydent les polyols par une solution aqueuse à saturation de quinhydrone, dans laquelle ils ajoutent du sulfate ou du chlorure ferrique de façon que la solution renferme un milligramme de fer par centimètre cube. Les auteurs obtiennent des poids de sucre 1.000 fois supérieurs au poids de fer mis en œuvre. Il se produit, par cette oxydation, des aldoses et des cétooses. Malheureusement la réaction ne s'arrête pas à ces stades, elle donne des produits d'oxydation plus avancés.

Une autre technique due à WEFERS BETTINK [46] se base également sur l'oxydation du polyol. L'auteur procède de la façon suivante : il dissout 1 centigramme de mannitol dans 1 centimètre cube d'acide sulfurique dilué et il ajoute trois gouttes de solution à 1 pour 25 de bichromate de potassium. Il fait bouillir pendant une minute. La solution est ensuite rendue légèrement alcaline par la soude. On filtre et on additionne le mélange de 1 centimètre cube de liqueur de Fehling. On fait bouillir. Par oxydation, le mannitol est transformé en son aldéhyde correspondant, le d-mannose, qui réduit énergiquement les sels de cuivre. D'après l'auteur, il faut s'assurer que la solution contenant le polyol ne renferme pas de substances réductrices ni de saccharose, ni de corps susceptible de donner, dans ces conditions, du réducteur. Or, précisément nos dosages portent, aussi bien dans le Céleri que dans le *Sterigmatocystis*, sur des substances rentrant dans cette catégorie. D'autre part, s'il faut extraire le mannitol à l'état de pureté avant de le doser, il est plus simple et plus sûr de procéder directement par la méthode de la pesée. Il y a encore d'autres méthodes d'oxydation : mais elles présentent toujours le même inconvénient : c'est de partir du mannitol pur.

Toutes ces méthodes chimiques ne peuvent convenir pour nos recherches physiologiques.

Le mannitol possède un léger pouvoir rotatoire. Il dévie la lumière polarisée vers la gauche d'environ 15 minutes

d'après BOUCHARDAT [3]. Ce pouvoir rotatoire est trop faible pour pouvoir être utilisé dans un dosage. Mais les alcools polyatomiques présentent la curieuse propriété optique de prendre un pouvoir rotatoire élevé quand on les additionne de certaines substances. D'après VIGNON [43-44], en présence d'acide borique et surtout de borax en excès, le mannitol devient fortement dextrogyre. Un mélange de 10 p. 100 de mannitol et de 12,8 de borax anhydre donne pour $[\alpha]_D$ une valeur égale à + 22°5. Le dosage au polarimètre devient possible. Les résultats obtenus seront valables jusqu'à la limite de 5 à 6 p. 100 de mannitol contenu dans la solution. Car, comme l'a indiqué MULLER, dans ces limites, la déviation est proportionnelle à la concentration.

BADREAU [2], dans sa thèse de Pharmacie, a montré que l'acide arsénieux jouit des mêmes propriétés que l'acide borique et qu'il ne présente pas d'inconvénients pour le dosage du polyol dans le jus des végétaux. VIGNON avait déjà trouvé qu'en présence d'acide arsénique le mannitol devient faiblement dextrogyre. BADREAU note pour une solution contenant :

Mannitol	0 gr. 910
Acide arsénieux pur	0 gr. 099
Eau	q. s. pour 50 cm ³ .

une déviation de 0°15' soit $[\alpha]_D = 2°44'$.

Il montre que le carbonate de potasse et le carbonate de soude provoquent une exaltation dextrogyre du mannitol. Il est donc amené à utiliser l'une de ces deux substances pour dissoudre l'acide arsénieux à une concentration suffisante pour avoir un pouvoir rotatoire notable. Il trouve pour le mélange suivant :

Mannitol	0 gr. 910
Acide arsénieux pur	1 gr. 980
Carbonate de soude pur sec	1 gr. 060
Eau	q. s. pour 50 cm ³

une déviation de 3°34'. Si on double la quantité de carbonate de soude la déviation devient 3°45'. Il propose une formule

de solution arsenicale que nous avons adoptée après divers essais et qui nous a donné d'excellents résultats :

Acide arsénieux pur	198 gr.
Carbonate de soude pur sec . .	132 gr. 5
Eau q. s. pour	1.000 cm ³

On fait la solution à chaud, en dissolvant d'abord le carbonate de soude, puis on filtre et on obtient un réactif prêt pour l'emploi, après refroidissement. Dans le dosage, il faut s'arranger pour que le poids d'acide arsénieux contenu dans le mélange final soit au moins 17 fois et demie supérieur à la quantité de mannitol trouvée.

BADREAU a étudié l'influence d'un certain nombre de substances sur le mélange mannitol + acide arsénieux.

Nous les classerons en actives et en inactives.

Substances actives : alcool éthylique, quercitol, inositol, érythritol, arabitol, volémitol, perséitol, acide tartrique droit, acide malique. Substances inactives : glycérol, penta-érythritol, d-sorbitol, xylose et arabinose, glucose, galactose, lévulose, sorbose, sucre interverti, saccharose, lactose, tréhalose, maltose, stachyose, dextrines, cellulosine.

Nous voyons qu'en règle générale les alcools polyatomiques ont une action sur le mélange mannitolo-arsénical. Ils ne sont donc pas dosables en mélange, parce qu'ils se comportent chacun comme s'ils étaient seuls dans la solution. Les sucres, en général, ne sont pas influencés par l'acide arsénieux. Or, avec la méthode d'extraction que nous employons, nous ne nous trouvons guère en présence que d'une solution de sucres : les acides-alcools notamment sont éliminés par le sous-acétate de plomb. L'alcool ordinaire a une action sur le pouvoir rotatoire du mélange mannitolo-arsénical. Nous employons l'alcool pour l'extraction, mais nous l'éliminons par distillation et au stade où nous poussons la distillation, il n'en reste plus trace. D'ailleurs nous avons vérifié qu'en ajoutant deux ou trois gouttes d'alcool à 95° dans un flacon de 50 centimètres cubes de liqueur préparée pour le dosage, nous n'avons pas de modification sensible de la déviation. Or, nous avons ajouté là une quantité d'alcool beaucoup plus considérable que celle qui pour-

rait se trouver dans la solution par suite d'une distillation très défectueuse. La seule précaution à prendre, c'est de s'assurer une fois pour toutes que, dans la plante considérée, l'alcool polyatomique que l'on veut doser se trouve seul représenté.

Le dosage du mannitol est donc fait d'après cette méthode, au polarimètre. Le liquide obtenu, comme nous l'avons dit précédemment, est passé sur trois filtres plats pour éliminer toute trace de carbonate de plomb. Ce précipité est en effet quelquefois extrêmement ténu, cependant la moindre trace de substance solide contenue dans le tube diminue de beaucoup la précision d'un dosage polarimétrique effectué sous une épaisseur de 5 décimètres. On fait une première lecture avec ce tube, ce qui donne α_1 . Puis on prend 20 centimètres cubes de liqueur et on complète à 50 centimètres cubes avec de l'eau distillée. On fait une seconde lecture qui nous donne α_2 . Une seconde portion de 20 centimètres cubes est complétée à 50 centimètres cubes avec la solution arsenicale dont nous avons donné la formule. On procède à une troisième lecture, α_3 . Le chiffre noté définitivement pour $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ est la moyenne entre 4, 6 ou 8 lectures, suivant les difficultés de celles-ci. Il est rare que l'écart maximum entre les lectures extrêmes dépasse 4'. Dans ces conditions, l'erreur commise est de moins d'une minute.

La valeur d' α_1 sert de contrôle à celle d' α_2 . $\alpha_1 - \alpha_2$ donne la déviation correspondant au mélange mannitol + acide arsénieux dont la déviation $[\alpha]_D$ est égale à $+ 46^\circ 53'$, soit en valeur décimale : 46,883. Pour calculer le poids de mannitol contenu dans 20 centimètres cubes de solution initiale, il ne reste plus qu'à appliquer la formule

$$p = \frac{x \times 50}{t \times 46,883}$$

ou plus simplement, puisque nous nous servons toujours du même tube de 5 décimètres, $p = x \times 0,213$.

D'après ce que nous avons dit précédemment, la quantité de mannitol se trouvant dans 20 centimètres cubes de solution ne doit pas excéder 0 gr. 339. Si cette valeur est dépassée, il faut diluer le liquide et recommencer le dosage.

Mlle BRAECKE a étudié le mannitol du *Rhinanthus Crista-Galli* [14], par la méthode de BADREAU et a montré que la déviation

donnée par cet auteur correspondait exactement à celle qu'elle a trouvée elle-même.

Les vérifications que nous avons faites ont porté, d'une part, sur le mannitol pur du commerce et, d'autre part, sur le mannitol contenu dans le Céleri, pour la raison qu'il est facile de se procurer des quantités importantes de tubercules de cette plante.

Les mesures que nous avons effectuées sur le mannitol du commerce nous ont conduit à admettre le pouvoir rotatoire spécifique indiqué par l'auteur. Celles que nous avons faites sur le Céleri peuvent se résumer de la façon suivante.

Nous avons fixé 150 grammes de tubercules. Le liquide obtenu a été divisé en deux parties égales. Les fragments de racines ont été répartis en deux lots semblables. Chacun de ces lots a été broyé à la machine. L'épuisement a été fait comme pour le *Sterigmatocystis*, par l'alcool bouillant, pour le premier lot. Mais avant de procéder à l'épuisement du second lot, nous avons ajouté 1 gramme de mannitol du commerce dans le liquide. La quantité de mannitol décelée dans le premier lot a été de 0 gr. 583 et, dans le second, de 1 gr. 553. La différence de 0 gr. 970 correspond à 3 p. 100 près au gramme de polyol introduit.

Nous avons répété cette expérience d'une autre façon. Nous avons fait deux dosages dans un tubercule fendu par le milieu. L'un a été effectué immédiatement et l'autre après plusieurs mois de conservation du matériel dans l'alcool. Les chiffres ont été concordants à 4 p. 100 près. Dans certains cas, nous avons obtenu une précision plus grande.

Ces vérifications nous semblent suffisantes pour démontrer que la méthode polarimétrique convient parfaitement aux dosages du mannitol, que l'on peut avoir à faire chez les végétaux. Elle présente l'avantage de la rapidité, car une analyse peut être terminée dans une journée. Elle nécessite par contre une certaine habitude du polarimètre, car les erreurs sont faciles à commettre, surtout dès que les jus sont un peu colorés.

La coloration rouge étant le principal obstacle aux lectures polarimétriques, il faut éviter d'introduire un corps susceptible de virer dans cette teinte en milieu alcalin, car la solution arsenicale est fortement alcaline, à cause de l'excès de carbo-

nate de soude jouant le rôle de dissolvant. Il ne faut donc ajouter aucun colorant à la liqueur après traitement par le sous-acétate de plomb pour marquer la fin de la précipitation du plomb par le carbonate de soude : il virerait à nouveau au moment de l'introduction de la solution arsenicale.

Le réducteur est recherché et dosé par la méthode de G. BERTRAND. Cette méthode est trop couramment employée dans les laboratoires pour que nous la décrivions à nouveau. Nous voulons simplement signaler l'intérêt qu'il y a à posséder de bons filtres d'amiante, car la précision du dosage en dépend. Or la qualité d'un filtre de cette nature tient uniquement à la qualité de l'amiante qui le constitue. Il faut absolument rejeter l'amiante cardée qui laisse passer l'oxydure de cuivre ou qui arrête toute filtration en très peu de temps. Il faut se procurer de l'amiante en grosses fibres brillantes, présentant un aspect nacré, et faire le filtre comme il est dit dans le guide des manipulations de chimie biologique de G. BERTRAND. Dans ces conditions, un filtre peut servir plusieurs centaines de fois, tout en filtrant bien et très rapidement.

Nous étudierons l'évolution du mannitol et du tréhalose dans le *Sterigmatocystis* en rapport avec l'aliment fourni et la quantité d'acide formé. Dans un premier chapitre, nous décrirons l'évolution de ces substances dans des cultures faites sur milieu normal, contenant comme source d'azote, de l'azotate d'ammoniaque et comme source de carbone, du saccharose. Les conclusions que nous formulerons nous conduiront à rechercher le rapport qui peut exister entre le tréhalose et le mannitol et cela fera le sujet de notre second chapitre où, par une voie détournée (cultures sur milieu devenant fortement acide), nous essayerons de résoudre cette question. Le troisième chapitre qui aura trait à l'évolution des substances dans le *Sterigmatocystis* cultivé en milieu maintenu constamment neutre, viendra à l'appui de la démonstration précédente. Dans un quatrième chapitre, nous verrons ce que deviennent les substances étudiées quand on fournit l'une d'elles, le mannitol, comme aliment au mycélium. Dans un cinquième chapitre, nous étudierons les réactions du mycélium dans un milieu contenant un mélange de saccharose et de mannitol et nous verrons que les

conclusions que nous pourrons en tirer seront applicables à l'utilisation du mannitol par le tubercule de Céleri. Enfin un dernier chapitre sera consacré à l'étude de la respiration du *Sterigmatocystis* végétant sur les différents milieux étudiés.

III. Cultures sur milieu à l'azotate d'ammoniaque et au saccharose.

Cette première série de cultures est destinée à mettre en évidence l'évolution normale du mannitol et du tréhalose dans le mycélium du *Sterigmatocystis*.

La composition du milieu de culture à l'azotate d'ammoniaque, que nous appellerons désormais le milieu normal est la suivante :

Saccharose	gr. 46,66
Azotate d'ammoniaque	3,563
Sulfate de magnésie cristallisé	0,400
Phosphate monopotassique	0,944
Sulfate ferreux sec	0,023
Sulfate de zinc cristallisé	0,046
Eau distillée q. s. pour	1000

En pratique, pour éviter la pesée fastidieuse des produits à chaque nouvelle série de cultures, on prépare, comme l'a fait MOLLIARD, des solutions de réserve dont il suffit de prendre 50 centimètres cubes pour chacun des cinq produits, d'y ajouter le sucre nécessaire et de compléter à un litre.

Les solutions de réserve ont cette composition :

Azotate d'ammoniaque	gr. 71,26
Eau distillée q. s. pour	1000
Sulfate de magnésie cristallisé	8
Eau distillée q. s. pour	1000
Phosphate monopotassique	18,88
Eau distillée q. s. pour	1000
Sulfate ferreux sec	0,46
Eau distillée q. s. pour	1000
Sulfate de zinc cristallisé	0,92
Eau distillée q. s. pour	1000

Cette méthode a, en plus de sa rapidité, d'autres avantages. Elle permet de faire des dosages rigoureux puisqu'ils se ramènent à une mesure de volume dans un ballon jaugé. Elle assure également l'homogénéité des liquides de culture, puisqu'avec un litre de solution de chacun des cinq produits on peut faire vingt litres de milieu nutritif, c'est-à-dire une série complète d'analyses. Comme nous avons vu que le *Sterigmato-cystis* est un champignon extrêmement sensible à diverses influences, il n'est pas négligeable de supprimer une des causes possibles de variations.

Le liquide ainsi obtenu est réparti dans des fioles coniques d'ERLENMEYER d'un litre, aussi semblables que possible. Dans chacune, on en introduit 130 centimètres cubes. Les flacons, bouchés avec un bouchon de coton cardé, sont munis d'un capuchon de verre ou de papier fort et portés à l'autoclave que l'on fait monter à 120°. Cette température est maintenue pendant vingt minutes. Les fioles sont sorties peu de temps après que la pression est tombée à 0. De cette façon, on évite que de l'eau se condense sur les cotons.

Après refroidissement complet, les fioles sontensemencées avec des spores bien pulvérulentes, provenant de tubes de carotte ou de pomme de terreensemencés depuis au moins 15 jours. L'ensemencement est effectué avec une spatule de platine rougie à la flamme, avant l'introduction dans chaque nouveau flacon. On répand assez de spores pour que le liquide soit couvert d'un voile léger. Le poids de substance que l'on peut introduire de la sorte n'intervient pas dans nos recherches sur les sucres. On procède aux ensemencements de préférence à 9 heures et à 17 heures par la méthode de MOLLARD, de façon à diviser la journée en trois fractions de huit heures. L'ordonnance d'une série sera celle-ci : ensemencement à 9 heures, récolte le lendemain à 9 heures, durée de la culture 24 heures ; ensemencement à 9 heures, récolte le lendemain à 17 heures, durée de la culture 32 heures ; ensemencement à 17 heures, récolte le surlendemain à 9 heures, durée de la culture 40 heures, etc. De cette façon les points successifs sont séparés par 8 heures et cette durée devient l'unité de temps du *Sterigmatocystis*. Comme nous l'avons vu antérieurement, un

moment important dans la physiologie du champignon est caractérisé par la sporulation. Dans cette série, la fructification commence entre 64 et 72 heures. La germination a lieu à 16 heures et le liquide est bien couvert à 24 heures.

Les dosages sont faits par la méthode exposée précédemment et sont tous rapportés à un mycélium ou à un liquide de culture.

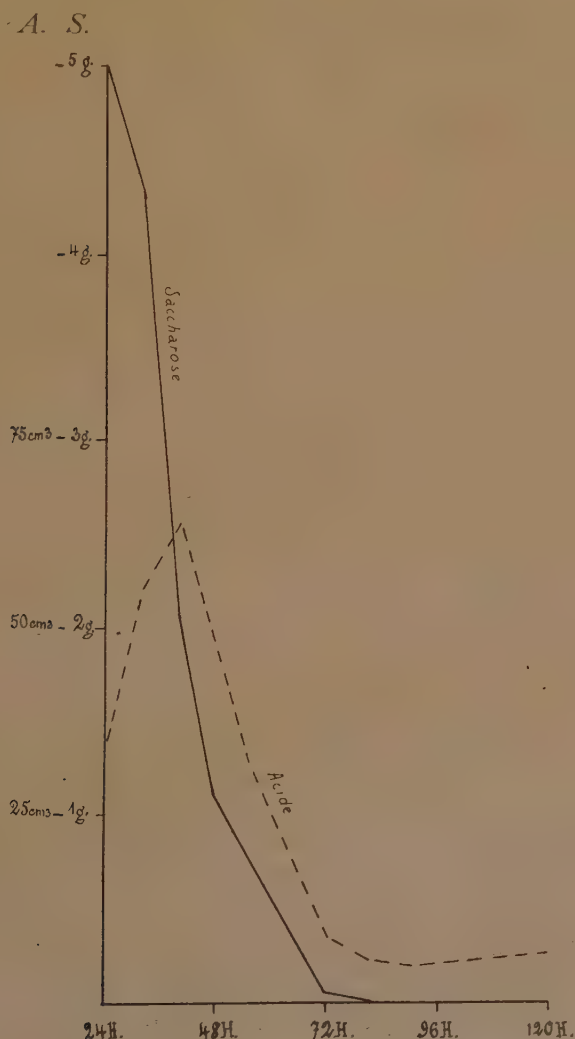
Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Temps de culture	Liquide de culture		Mycélium		
	Sucre restant	Acide formé en potasse décinormale	Poids sec d'un mycélium	Mannitol	Tréhalose
	gr.	cm ³	gr.	gr.	gr.
24 heures	5,026	33	0,584	0,043	0,004
32 —	4,290	55	1,442	0,102	0,019
40 —	2,070	64	1,996	0,156	0,022
48 —	1,096	47	2,079	0,206	0,015
55 —	0,770	32	2,253	0,176	0,023
72 —	0,039	9	2,448	0,114	0,128
80 —	0	6	2,203	0,084	0,133
89 —	0	5	1,948	0,068	0,123
119 —	traces	7	1,646	0,052	0,066

Les nombres consignés dans ce tableau ont servi à établir les deux graphiques ci-dessous. Dans le premier on a porté, en fonction du temps, les quantités de sucre restant dans un liquide de culture et d'acide formé. Il a été introduit 7 grammes de saccharose dans chaque flacon. Le sucre restant est dosé sous forme de réducteur. Jusqu'à 40 heures, on trouve du saccharose en nature dans le liquide, et dans ce cas le dosage est fait après hydrolyse par la sucrase. L'acide est exprimé en centimètres cubes de potasse décinormale nécessaires pour neutraliser l'acide libre présent dans une culture, l'indicateur coloré étant la phénolphtaléine. Dans le second graphique, on a figuré le poids sec du mycélium et les quantités de mannitol et de tréhalose contenues dans un mycélium.

L'utilisation du sucre est au début très rapide, puis elle diminue progressivement au fur et à mesure que la concentration du milieu baisse. A 72 heures, moment où la fructification se produit, on ne trouve plus que quelques milligrammes de

réducteur. A 80 heures, il n'y a plus trace de sucre. Ultérieurement à 119 heures, le liquide redevient faiblement réducteur. Mais il faut remarquer qu'à ce moment le mycélium est en



Graphique 1. — Utilisation du saccharose et évolution de l'acidité dans un liquide de culture normal. En abscisse : le temps de culture. En ordonnée : le poids de saccharose restant, exprimé en réducteur (échelle S) et l'acidité formée (échelle A).

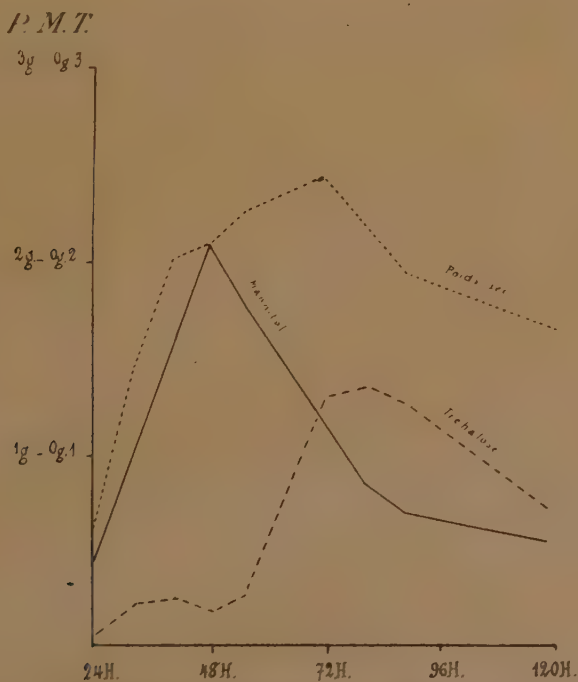
pleine autolyse puisqu'il a déjà consommé 0 gr. 6 de sa propre substance pour assurer sa respiration et que le corps réducteur apparu à l'état de traces n'est vraisemblablement pas du sucre. D'ailleurs l'oxydule de cuivre formé n'est pas rouge, comme lorsqu'il est produit par du glucose ou du lévulose, mais il présente une teinte jaune.

L'acidité du liquide est, dès les premiers temps de la végétation, assez considérable : jusqu'à 24 heures on trouve 33 centimètres cubes contre 64 à 40 heures, ce qui correspond au maximum observé dans ces cultures. L'accroissement de la quantité d'acide après 24 heures est très rapide dans les huit heures suivantes. Il se ralentit déjà de 32 à 40 heures. Après cette époque, l'acide disparaît progressivement de la culture. Le mycélium a d'abord réagi contre la tendance à l'alcalinité du milieu, puis il utilise l'acide formé et, au moment où tout le sucre est consommé, on trouve une valeur minima pour l'acidité. A 80 heures, 6 centimètres cubes de potasse décimale sont nécessaires pour neutraliser l'acide d'un flacon, à 89 heures, 5 centimètres cubes et à 119 heures, 7 centimètres cubes. A 119 heures, le dosage est difficile à faire parce que le liquide est coloré par le pigment noir du *Sterigmatocystis* qui s'y est dissous. Nous dirons donc qu'à partir de 80 heures la valeur de l'acidité est stable : les chiffres 6, 5 et 7 pouvant être considérés comme pratiquement identiques.

En milieu normal, on peut donc comprendre l'évolution de l'acidité de la façon suivante : dès la germination des spores, le mycélium rend le liquide fortement acide (+ 33 centimètres cubes de 16 à 24 heures). Cette réaction acide devient de moins en moins intense à mesure que le mycélium se développe (+ 22 centimètres cubes de 24 à 32 heures et + 9 centimètres cubes de 32 à 40 heures). A un certain moment, le mycélium au lieu de former de l'acide, consomme celui qu'il a élaboré d'une façon à peu près proportionnelle au temps (— 17 centimètres cubes de 40 à 48 heures ; — 15 centimètres cubes de 48 à 55 heures) jusqu'au moment où ne trouvant presque plus de sucre dans le liquide, il ralentit sa végétation. Quand tout le sucre est disparu, tout l'acide utilisable est également absorbé.

Le poids sec du mycélium apparaît comme assez considéra-

ble à 24 heures quand on se représente que huit heures auparavant il était à peu près nul. L'accroissement dans la période suivante atteint une grande intensité puisqu'il est de 1 gramme en huit heures. L'augmentation est ensuite d'autant moins rapide que le mycélium trouve à sa disposition moins de sucre et le poids maximum est atteint au moment où tout le sucre est



Graphique 2. — Evolution du mannitol et du tréhalose dans un mycélium cultivé sur liquide normal. En abscisse : le temps de culture. En ordonnée : le poids sec du mycélium (échelle P) et le poids de mannitol et de tréhalose formé (échelle commune MT).

consommé : la fructification commence et l'autolyse va entrer en jeu pour faire diminuer le poids du champignon. De 72 à 80 heures, la perte de substance est de 30 milligrammes à l'heure, contre 28 dans la période suivante et 10 dans celle qui va de 89 à 119 heures.

Si l'on considère la quantité de mannitol existant dans le mycélium aux différentes époques, on voit qu'elle augmente

régulièrement jusqu'à 48 heures. A 16 heures, la germination débutant, on peut considérer que le polyol n'existe pas. De 16 à 24 heures, il s'en est donc formé 43 milligrammes; de 24 à 32 heures, 59 milligrammes; de 32 à 40 heures, 54 milligrammes et de 40 à 48 heures, 50 milligrammes. Toutes ces valeurs sont du même ordre. La formation et l'accumulation du polyol sont donc proportionnelles au temps au début de la végétation, au moment où celle-ci est très active. Ensuite le mannitol disparaît du mycélium. Le changement de sens du graphique se produit à 48 heures au moment où il n'y a plus que 1 gr. 1 de sucre dans le liquide. Tout se passe donc comme si une forte concentration en sucre entraînait la formation du polyol par le champignon alors qu'une faible teneur en déterminait l'utilisation, la limite étant marquée par la valeur d'environ 1 p. 100 de glucide restant dans le liquide. Nous verrons, en étudiant le Céleri, que nous retrouverons un phénomène analogue. Après 48 heures, alors que le poids sec du mycélium augmente encore dans de notables proportions, la teneur en polyol diminue. A partir de 72 heures, l'autolyse fait décroître le poids du mycélium et l'utilisation du mannitol n'est pas plus rapide que dans la période précédente. A 119 heures, le mycélium a brûlé 0 gr. 8 de sa propre substance et cependant on y trouve encore 0 gr. 050 de polyol.

Si on étudie, non plus la quantité absolue de ce corps contenue dans un mycélium, mais sa proportion relative par rapport au poids sec du champignon, on voit que de 32 à 48 heures sa teneur augmente: elle passe de 7 à 10 p. 100. Après 48 heures elle décroît, et à 72 heures elle est déjà tombée à 3,8. Par conséquent la cellule du *Sterigmatocystis*, pendant la période où elle trouve un aliment carboné très abondant, forme du mannitol de préférence aux autres substances, et lorsque la source de carbone vient à diminuer, le filament utilise d'abord le polyol qu'il a accumulé. Il ne s'agit pas là d'une disparition de substance pendant l'autolyse, qui ne présenterait pas un grand intérêt du fait que le poids total du mycélium baisse également. Au contraire le mannitol diminue dans la phase constructive de la vie du champignon, alors que la cellulose qui le compose, notamment, augmente dans de grandes

proportions. Il faut donc supposer que le polyol n'est pas simplement détruit par la fonction respiratoire mais qu'il subit des transformations qui l'amènent à entrer dans la constitution d'autres éléments du mycélium. A ce moment, entre 48 et 72 heures, le liquide n'est pas épuisé, il contient encore des sels minéraux assez abondants et une certaine quantité de sucre interverti. On peut donc dire que si le polyol est utilisé concurremment avec le sucre, c'est qu'à la concentration où celui-ci se trouve dans le milieu, il ne représente pas un potentiel d'énergie utilisable supérieur à celui qui correspond au mannitol contenu dans le mycélium. Il serait intéressant de voir ce que deviennent le sucre et le polyol quand on en fournit un mélange au champignon. Nous verrons ultérieurement les résultats auxquels conduit cette expérience.

Au point de vue du mannitol, on peut conclure que cette substance est sous la dépendance directe du sucre présent dans le liquide à chaque moment. Si nous essayons de faire un rapprochement avec une autre variable, la quantité d'acide contenue dans le milieu, par exemple, on trouve bien que, dans les premières heures, l'évolution du polyol est parallèle à celle de l'acide, mais à partir de 40 heures, la quantité d'acide diminue et la teneur en mannitol, absolue et relative, continue à augmenter. Nous allons voir, en étudiant le tréhalose, quel intérêt présente ce rapprochement.

L'évolution du tréhalose se fait en sens inverse de celle du mannitol. Jusqu'à 55 heures, les quantités qu'on peut déceler dans le mycélium sont faibles et à peu près constantes. Puis brusquement, de 55 à 72 heures, la teneur augmente. Cet accroissement se produit au moment où débute la fructification, où il n'y a presque plus de sucre dans le liquide, où l'acidité diminue et où le mannitol disparaît. Le tréhalose étant une substance qui, au point de vue chimique, est tellement voisine du saccharose, qu'on a pu l'appeler le saccharose des champignons, il est assez curieux de constater que la formation de ce corps ne se produit pas au moment de la plus forte teneur en sucre du liquide, mais précisément quand il n'y en a presque plus. Il est difficile de chercher, dans ce sens, une relation de cause à effet. Que le tréhalose se forme au moment où le

mycélium va commencer à diminuer de poids, cela découle des considérations précédentes. Nous nous trouvons donc en face de deux problèmes à étudier : relations du tréhalose avec la diminution de l'acidité, d'une part, et avec la disparition du mannitol, d'autre part. Ces questions seront envisagées dans le chapitre suivant. Après 72 heures de culture, la teneur en tréhalose augmente encore légèrement, puis diminue un peu jusqu'à 89 heures. En réalité les trois valeurs : 0,128, 0,133 et 0,123 sont suffisamment voisines pour qu'on puisse admettre que, pendant la période qui va de 72 à 89 heures, la quantité de tréhalose est à peu près invariable. De 89 à 119 heures, la teneur diminue de moitié. Mais à ce moment l'autolyse est très avancée et on ne peut tirer de ce fait d'autre conclusion, si ce n'est que le tréhalose disparaît au moment de l'autolyse, comme toutes les autres substances contenues dans le mycélium.

La conclusion qui se dégage de ces premières analyses au point de vue qui nous intéresse, c'est que le mannitol est une substance qu'élabore le *Sterigmatocystis* tant qu'il a une forte proportion de sucre à sa disposition. Dès que la teneur en saccharose du liquide vient à diminuer, le polyol est utilisé. Pendant cette utilisation se forme du tréhalose qui disparaît à son tour quand l'autolyse est assez avancée.

IV. Cultures sur milieu au chlorhydrate d'ammoniaque et au saccharose.

La composition de ce milieu de culture est identique à celle du précédent, sauf en ce qui concerne la source d'azote. L'azotate d'ammoniaque est ici remplacé par le chlorhydrate. Pour préparer les liquides par la même méthode que précédemment, on fabrique une solution de réserve de chlorhydrate d'ammoniaque à 93,3 pour 1.000 dont on prend 50 centimètres cubes pour faire un litre de solution.

Nous avons vu antérieurement que les cultures faites sur ce milieu ne fructifient pas et que le liquide devient fortement acide. En milieu normal, le liquide, par le jeu des phénomènes vitaux, tend à devenir alcalin et, selon MOLLARD [34], le champignon fabrique un acide qui est de l'acide oxalique. Dans le

milieu au chlorhydrate, l'acidité qui est beaucoup plus forte à une autre origine. En réalité les acides organiques formés sont peu abondants, mais, dans le chlorhydrate d'ammoniaque, l'utilisation de l'ion Az de AzH^+ amène la mise en liberté de l'ion Cl qui se combine avec H pour donner de l'acide chlorhydrique. L'acide produit est donc ici un acide minéral.

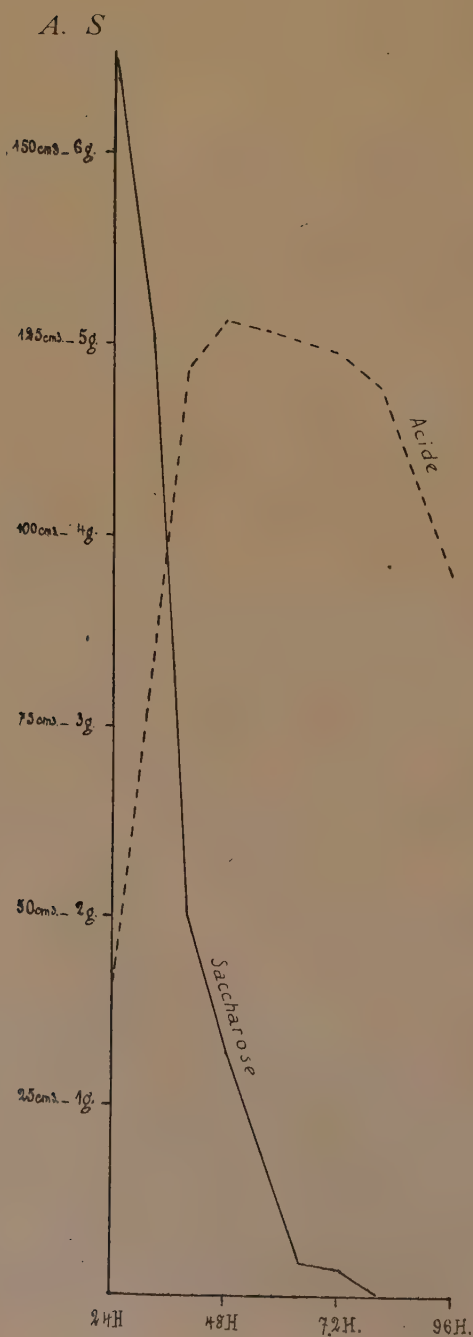
La germination des spores a lieu vers 16 heures et le liquide est bien couvert au bout de 24 heures comme précédemment. Le mycélium s'épaissit, se plisse, et vers 72 heures il présente à peu près le même aspect que sur milieu normal, sauf qu'il ne porte pas de conidies.

Dans le tableau suivant, nous avons résumé nos analyses concernant ce milieu. Les résultats sont rapportés, comme précédemment, à un liquide de culture et à un mycélium.

Temps de culture	Liquide de culture		Mycélium		
	Sucre restant	Acide formé en potasse décinormale	Poids sec d'un mycélium	Mannitol	Tréhalose
	gr.	cm ³	gr.	gr.	gr.
24 heures	6,451	40	0,406	0,011	0,003
32 —	5,042	79	1,085	0,093	0,004
40 —	4,980	122	2,089	0,139	0,013
48 —	4,271	128	2,369	0,157	0,016
56 —	0,728	127	2,379	0,139	0,012
64 —	0,160	125	2,422	0,115	0,013
72 —	0,118	124	2,465	0,107	0,013
80 —	0	120	2,420	0,079	0,023
88 —	0	107	2,384	0,075	0,025
96 —	0	95	2,248	0,045	0,031

Les nombres figurant dans ce tableau ont servi à établir les graphiques 3 et 4. Les indications et l'échelle sont semblables à celles des graphiques précédents.

L'utilisation du sucre dans ce cas est comparable à celle qui se produit en milieu normal. Remarquons toutefois qu'elle est un peu moins rapide dans les premiers temps de la végétation. En effet il reste nettement plus de sucre à 24 et à 32 heures en présence de chlorhydrate qu'en présence d'azotate d'ammoniaque. Plus tard les deux vitesses d'utilisation deviennent



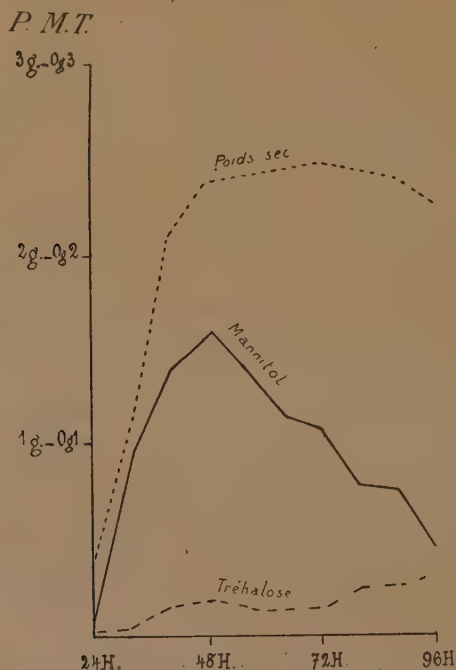
Graphique 3. — Utilisation du saccharose et évolution de l'acidité dans un liquide de culture acide.

égales et à 80 heures dans un cas, comme dans l'autre, on ne trouve plus trace de réducteur.

La quantité d'acide formée va en augmentant depuis 24 jusqu'à 48 heures. Entre 24 et 32 heures, elle est d'environ 5 centimètres cubes à l'heure et de 32 à 40 heures, de 5 cm³ 3. Nous arrivons très vite à un maximum. Les nombres 128, 127, 125 et 124 sont en réalité comparables. Leur différence d'environ 3 p. 100 s'explique suffisamment par les erreurs de dosage. Par contre, après 72 heures, la quantité d'acide libre présent dans le liquide diminue nettement. Dans le milieu à l'azotate d'ammoniaque, l'acide formé est détruit par le mycélium. Dans le cas présent, c'est de l'acide chlorhydrique qui est libéré et il est inutilisable pour le champignon. Sa disparition a donc une autre cause. En effet après 72 heures, quoiqu'il n'y ait pas de formation de conidies, le mycélium entre dans sa période d'autolyse. A ce moment, de l'ammoniaque est produit et cette base avec l'acide chlorhydrique donne du chlorure d'ammonium. La diminution de l'acidité du liquide marque donc ici les progrès de l'autolyse. On peut vérifier que l'acide fabriqué est bien de l'acide chlorhydrique par l'exemple numérique suivant. Dans un flacon de culture, il y a 150 centimètres cubes du liquide dont nous avons donné la composition au début de ce chapitre. Dans ces 150 centimètres cubes, il y a 0 gr. 714 de ClAzH_4 qui correspondent à 0 gr. 473 de Cl soit à 0 gr. 486 d'HCl. En supposant que tout le chlorhydrate d'ammoniaque ait été transformé en acide chlorhydrique, on doit trouver une quantité de potasse correspondante à ces 0 gr. 486. Or si nous prenons 126 centimètres cubes comme chiffre moyen obtenu à partir de nos dosages, nous voyons que ces 126 centimètres cubes renferment 0 gr. 705 de potasse qui sont susceptibles de neutraliser 0 gr. 460 d'acide chlorhydrique. La différence d'environ 5 p. 100 entre le nombre théorique et les données de l'expérience, est très acceptable et peut être mise sur le compte des erreurs d'expérience.

L'augmentation de poids sec du mycélium est, au début de la végétation, proportionnelle à la vitesse d'utilisation du sucre. En effet, si nous comparons les graphiques n° 2 et n° 4, nous voyons que, sur ce dernier, l'augmentation du poids du mycé-

lium est moins rapide jusqu'à 32 heures. Or, sur le graphique n° 3, nous remarquons que la quantité de sucre disparue est plus faible que sur le graphique n° 1. A partir de 40 heures, les poids des deux mycéliums s'égalisent à peu près et à 72 heures, le maximum est atteint, dans les deux cas, avec des valeurs tout à fait comparables : 2 gr. 448 contre 2 gr. 465. Après



Graphique 4. — Evolution du mannitol et du tréhalose dans un mycélium cultivé sur liquide acide.

72 heures commence l'autolyse. Remarquons qu'elle est moins rapide qu'en milieu normal, puisqu'à 88 heures le mycélium pèse 2 gr. 384 contre 1 gr. 948.

Au moment de l'autolyse, sur milieu à l'azotate d'ammoniaque, en plus des conidies, il se forme, à la surface du mycélium, une exsudation de gouttelettes de liquide coloré par le pigment noir du *Sterigmatocystis* : l'aspergilline. Au bout d'un certain temps, le mycélium s'immerge. Rien de comparable ne se produit en milieu acide.

La teneur en mannitol présente un maximum qui est atteint à 48 heures. Son augmentation est régulière comme dans le cas des cultures en milieu normal, mais le maximum est nettement moins élevé. Nous retrouvons ici ce fait que le mannitol augmente tant qu'il y a plus de 1 pour 100 de réducteur dans le liquide. Dès que la teneur en sucre tombe au-dessous de cette valeur, il est utilisé. En milieu normal, l'évolution du mannitol et celle de l'acidité sont parallèles jusqu'à 40 heures, mais à partir de ce moment, l'acide diminue alors que le polyol augmente. En milieu acide, nous avons vu que la valeur de l'acidité ne varie pas de 48 à 72 heures alors que, pendant ce temps, la quantité de mannitol diminue dans de notables proportions. Nous pouvons donc dire que la réaction du milieu n'influence en rien l'évolution du polyol, puisque celui-ci augmente quand l'acidité augmente et qu'il diminue quand elle continue à croître ou qu'elle reste stable. Après 72 heures, nous entrons dans la période d'autolyse, mais, comme en milieu normal, celle-ci ne semble pas retentir sur la vitesse de destruction du polyol. A 88 heures, dans la série à l'azotate d'ammoniaque, nous trouvons 0 gr. 068 de mannitol par mycélium contre 0 gr. 075 dans la série au chlorhydrate.

Si l'on étudie la teneur relative du mycélium en mannitol, on voit qu'elle s'accroît rapidement jusqu'à 32 heures. De 32 à 48 heures, elle se stabilise à une valeur un peu inférieure. A partir de 56 heures commence la décroissance que nous avons observée, au même moment, dans la série précédente. On peut donc admettre, pour ces cultures sur milieu acide, en ce qui concerne l'évolution du mannitol relativement au poids sec, les conclusions auxquelles nous étions arrivé antérieurement.

Dans le cas présent, le tréhalose n'existe jamais qu'en très petite quantité. Nous avons vu qu'en milieu normal, il est surtout abondant dans les cultures vieilles de 72 à 80 heures, c'est-à-dire au moment où le mannitol disparaît. Nous avons envisagé la possibilité d'une relation entre ces deux phénomènes. Cette série d'analyses prouve qu'il n'en existe pas. Sur liquide au chlorhydrate d'ammoniaque, l'évolution du mannitol est semblable à celle qui se produit sur milieu normal, et cepen-

dant la quantité de tréhalose contenue dans un mycélium est toujours très faible.

Nous verrons, en étudiant le Céleri, que ce fait dépasse le cadre de l'étude physiologique du *Sterigmatocystis* et qu'il permet de penser qu'il n'y a pas non plus de relation entre l'évolution du saccharose (voisin du tréhalose) et celle du mannitol chez le Céleri.

Par contre le rapprochement entre la formation de tréhalose et la diminution de l'acidité semble plus justifiée. Nous avons constaté qu'en milieu normal il y avait une différence de 100 milligrammes en faveur du tréhalose au moment où l'acidité diminuait de 32 à 9 centimètres cubes. Dans le cas présent, l'acidité baisse lentement. Elle passe de 124 à 120, à 107 et à 95 centimètres cubes pendant que le tréhalose subit des augmentations faibles de 13 à 23, à 25, et à 31 milligrammes. Ces deux phénomènes sont d'autant plus à rapprocher qu'en milieu acide la quantité de tréhalose est toujours très faible et que, pendant la période où l'acidité est constante, elle ne varie pas :

Temps de culture	Acidité	Tréhalose
40 heures	122	13
72 —	124	13

Les conclusions qui se dégagent de ce chapitre sont les suivantes : en milieu acide, l'évolution du mannitol est comparable à celle qu'on constate en milieu normal, mais la quantité absolue de polyol formée est moins considérable. Le tréhalose ne s'élabore pas en milieu au chlorhydrate d'ammoniaque et son apparition semble conditionnée par la diminution de l'acidité. Mannitol et tréhalose ne présentent donc aucune relation : ce sont deux substances évoluant chacune pour leur propre compte et dans des conditions essentiellement différentes.

V. Cultures sur milieu normal additionné de carbonate de calcium.

Après avoir fait des cultures sur un milieu devenant fortement acide, nous nous sommes proposé d'étudier les réactions du mycélium végétant sur un liquide dont l'acidité reste tou-

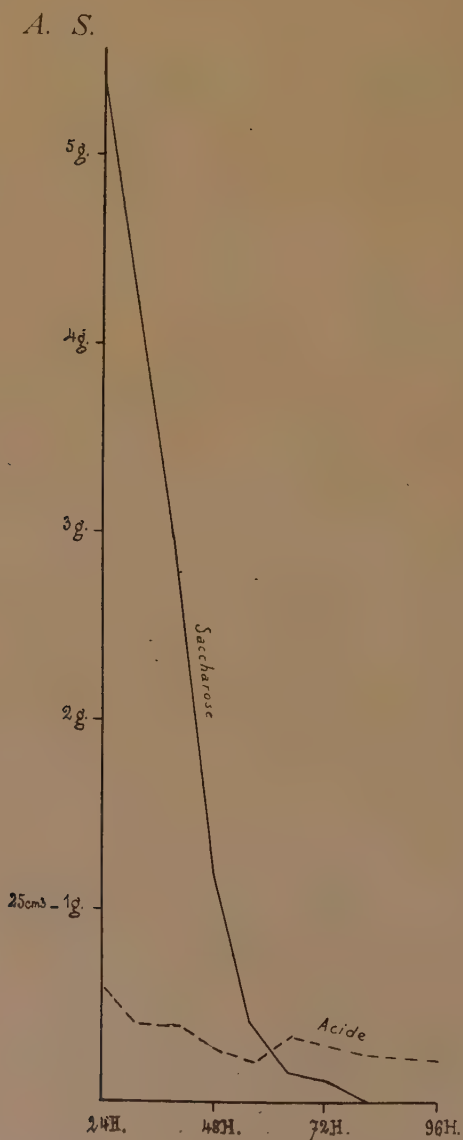
jours faible, toutes les autres conditions par ailleurs étant identiques. On prépare des flacons de culture contenant 150 centimètres cubes de milieu normal au saccharose et on y ajoute 0 gr. 5 de carbonate de chaux, avant stérilisation. Ce sel se solubilise au fur et à mesure que de l'acide est formé et le neutralise. Par conséquent, au point de vue de l'acidité, nous réalisons des conditions d'expérience diamétralement opposées à celles de la série précédente. Il se dégage, dans la réaction, du gaz carbonique qui ne semble pas intervenir, à cette dose, dans la vie du mycélium.

La germination des spores se fait en 16 heures et le liquide est couvert d'un voile léger mais complet en 24 heures comme dans les séries précédentes. Le mycélium se plisse abondamment et forme une croûte épaisse et solide, qui contraste avec celle qu'il produit en milieu acide et qui est beaucoup plus friable. La sporulation débute à 64 heures et elle est complète à 80 heures. Elle est cependant un peu différente de celle qui se fait sur milieu normal, car elle est d'un gris noirâtre ou même quelquefois verdâtre, alors que sur milieu normal les conidies arrivent à être absolument noires. Il se forme, au cours de l'autolyse, des gouttelettes de liquide sur le mycélium qui sont colorées par le pigment du *Sterigmatocystis*.

Les résultats de nos analyses sont figurés dans le tableau suivant. Les poids sont rapportés, comme précédemment, à un liquide et à un mycélium.

Temps de culture	Liquide de culture		Mycélium		
	Sucre restant	Acide formé en potasse décimorale	Poids sec d'un mycélium	Mannitol	Tréhalose
	gr.	cm ³	gr.	gr.	gr.
24 heures	5,387	13	0,568	0,053	0,006
32 —	4,002	10	1,690	0,133	0,036
40 —	2,835	10	2,142	0,163	0,056
48 —	1,181	7	2,826	0,285	0,076
56 —	0,406	5	2,838	0,235	0,115
64 —	0,142	8	3,181	0,215	0,128
72 —	0,095	7	3,115	0,210	0,147
80 —	0	6	3,078	0,158	0,230
96 —	0	5	3,044	0,080	0,226
120 —	0	—	2,189	0,030	0,155
152 —	0	—	1,089	0	0,024

Les graphiques 5 et 6, ci-dessous, sont la traduction de ces nombres.



Graphique 5. — Utilisation du saccharose et évolution de l'acidité dans un liquide de culture maintenu neutre.

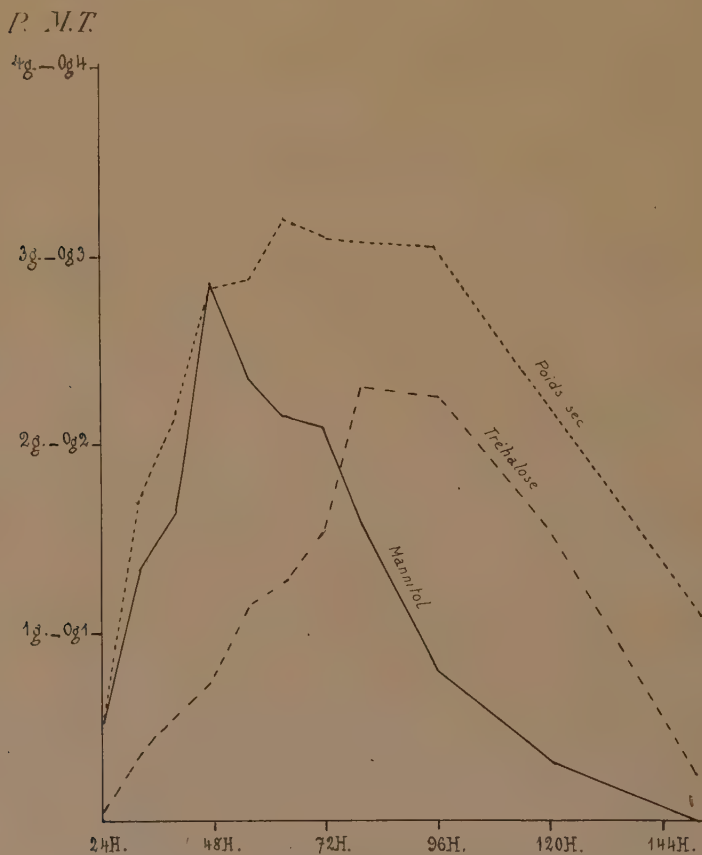
L'évolution du sucre dans le liquide est absolument comparable à celle qui se produit en milieu normal. Les deux graphiques sont presque superposables.

Par contre l'acidité est entièrement différente. A 24 heures elle est à peu près équivalente à celle du liquide immédiatement après la stérilisation. Mais au lieu d'augmenter, de passer par un maximum, puis de diminuer, elle décroît d'une façon continue et la valeur de 7 centimètres cubes qui peut être considérée comme le minimum obtenu est atteinte dès 48 heures, c'est-à-dire précisément au moment où, dans les autres milieux, elle présentait à peu près sa valeur maxima. Ajoutons que les chiffres 7, 5, 8, 7, 6 et 5 sont absolument comparables entre eux, les différences s'expliquant facilement par les erreurs de dosage.

Le but que nous nous sommes proposé, à savoir : modification d'une condition et maintien des autres, est donc atteint. Nous verrons que l'évolution des mycéliums est très comparable, les graphiques représentant l'utilisation du sucre sont à peu près identiques, mais l'acidité est minima au moment où, dans le témoin, elle est maxima.

Le poids du mycélium à 24 heures est assez voisin de celui de la première série : 0 gr. 568 contre 0 gr. 584. La germination s'est faite à 16 heures dans les deux cas. Mais dès la 32^e heure, le poids du champignon, sur milieu neutre, est plus élevé que sur milieu normal : 1 gr. 690 contre 1 gr. 442. A 64 heures, le maximum dans le premier cas est atteint avec 3 gr. 181, alors que le témoin présente un maximum moins élevé à 72 heures avec 2 gr. 448. A partir de 64 heures, commence la sporulation et dès 72 heures, l'autolyse se fait sentir. A ce moment il n'y a plus que 0 gr. 095 de réducteur dans le liquide. L'autolyse se poursuit ensuite et à 120 heures le poids du mycélium est de 2 gr. 189. En comparant ces résultats à ceux qui ont été obtenus chez le témoin, on voit que, dans le cas présent, de 64 à 120 heures, c'est-à-dire, en 56 heures, le poids a diminué de 0 gr. 992, soit 17 milligrammes à l'heure, alors que le mycélium témoin voit son poids varier de 0 gr. 802 de 72 à 119 heures, soit en 47 heures, ce qui correspond à une diminution horaire de 17 mg. 7. Ces deux nombres sont assez rapprochés pour que l'on puisse considérer que l'autolyse atteint, avec la même intensité, les mycéliums cultivés sur milieu normal et sur liquide maintenu neutre par addition de

carbonate de calcium. A ce point de vue encore les cultures sont comparables. Cependant le poids de substance formée est plus considérable, ce qui doit correspondre à une diminution de l'intensité respiratoire.



Graphique 6. — Evolution du mannitol et du tréhalose dans un mycélium cultivé sur liquide maintenu neutre.

L'évolution du mannitol ne présente pas de différence essentielle dans les deux milieux considérés. Le maximum de la teneur, dans les deux cas, est atteint à 48 heures, puis la diminution du polyol se fait suivant des allures comparables. A 24 heures, nous trouvons 0 gr. 053 de mannitol dans un mycélium, à 32 heures, 0 gr. 133; à 40 heures, 0 gr. 163 et à 48 heures,

0 gr. 285. Pendant ce temps, la progression est moins rapide chez le témoin 0,043 ; 0,102 ; 0,156 et 0,206. Le maximum est donc plus élevé quand le mycélium végète sur milieu maintenu neutre que sur liquide normal devenant acide. Mais en considérant que le poids de substance formé est plus considérable dans un cas que dans l'autre, on voit que la teneur en polyol est presque identique dans les deux cas. Elle est en effet de 10 p. 100 du poids sec dans le mycélium en expérience contre 9,9 p. 100 dans le témoin. Il est assez curieux de constater que la même teneur relative est atteinte, au même moment, dans les deux cas et après avoir passé par les mêmes valeurs, de 7,8 et 7,6 p. 100. Par contre en présence de carbonate de chaux, après 56 heures, la décroissance relative est moins rapide que chez le témoin. A 72 heures, en effet, elle est encore de 6,7 p. 100 contre 3,8.

La diminution absolue du polyol après 48 heures est absolument comparable à ce que nous avons vu antérieurement. L'autolyse, pas plus que dans les cas précédents, n'affecte la vitesse du phénomène.

Le graphique représentant l'évolution du tréhalose présente un aspect nouveau. De 24 à 32 heures, la quantité de tréhalose s'accroît de 30 milligrammes ; de 32 à 40 heures, elle passe de 36 à 56 milligrammes ; de 40 à 48 heures, de 56 à 76 milligrammes et cette augmentation se poursuit jusqu'à 80 heures, moment où le mycélium en contient 0 gr. 230. Le témoin, au même moment, n'en renferme que 0 gr. 133. Mais l'allure des graphiques correspondant à cette substance dans les deux mycéliums est plus intéressante à considérer que les valeurs atteintes aux différents instants. Dans le cas présent, l'augmentation du tréhalose est continue alors que dans le témoin on trouve un plateau de 32 à 55 heures, et ce n'est qu'à partir de ce moment qu'un accroissement brusque porte la quantité de tréhalose, de 23 à 128 milligrammes. Jusqu'à présent le mycélium témoin et celui qui est en expérience étaient en tous points comparables. Or nous trouvons ici une différence essentielle qu'on ne peut rapporter qu'à la seule condition variable : l'acidité du milieu. En liquide normal, la quantité de tréhalose reste stable tant que la réaction est franchement acide. Dès que l'acidité atteint

une valeur qui peut être considérée comme minima, le tréhalose augmente immédiatement dans de fortes proportions. Ici le milieu reste constamment presque neutre. Pendant ce temps, la quantité de tréhalose s'accroît jusqu'à une valeur qui n'a jamais été obtenue dans les analyses précédentes. L'évolution de cette substance est donc absolument opposée à celle qu'on observe en milieu acide. En effet, nous avons vu que dans un mycélium végétant sur milieu au chlorhydrate d'ammoniaque, toujours fortement acide, le poids du tréhalose reste constamment peu important. Il n'augmente un peu qu'au moment où une partie de l'acide est saturée par l'ammoniaque mis en liberté par l'autolyse. Après 80 heures, dans le champignon cultivé sur milieu neutre, la quantité de tréhalose se maintient stable jusqu'à 96 heures, puis diminue et présente une valeur très faible à 152 heures.

Dans ce cas nous assistons donc à une accumulation du tréhalose dès le début de la végétation. On peut être tenté de rapporter la quantité trouvée au poids du mycélium. On obtient, de la sorte, les valeurs suivantes en pour cent du poids sec : 1 ; 2,1 ; 2,1 ; 2,6 ; 4 ; 4 ; 4,7 ; 7,4 ; 7,4 ; 7 ; 2,2. On voit donc que le mycélium accumule le tréhalose jusqu'à 96 heures. Or nous savons qu'à 72 heures il n'y a plus de sucre dans le liquide. Donc, au moins entre 72 et 96 heures, le tréhalose a une autre origine directe que le sucre. Remarquons de plus que c'est surtout à partir du moment où le liquide est épuisé qu'on trouve la plus forte proportion de ce corps. Par conséquent il est bien probable que cette substance provient d'une autre substance contenue dans le mycélium, qu'elle représente un stade de la décomposition d'une molécule plus grosse. Entre 120 et 152 heures, c'est-à-dire en pleine autolyse, le tréhalose disparaît aussi bien d'une façon relative qu'absolue, donc il est utilisé.

Les conclusions de cette série de cultures sont les suivantes : le mannitol est une substance de réserve qui se forme tant que la teneur en sucre du liquide est assez élevée. Ici la limite que nous avons appelée seuil, dans les chapitres précédents, est de 1,18 p. 150. Dans les deux autres séries, elle était de 1,09 et 1,27. Tous ces nombres sont suffisamment rapprochés pour

que l'on puisse considérer que c'est réellement la teneur limite de 1,2 de sucre pour 150 centimètres cubes qui conditionne l'évolution du mannitol chez le *Sterigmatocystis*. Au-dessus de ce seuil, le polyol se forme, et en dessous, il est utilisé, quel que soit le liquide sur lequel est cultivé le champignon. D'autre part, le fait que le polyol subit une évolution toujours identique dans tous les milieux, indique bien qu'il n'est pas une substance faisant occasionnellement partie du mycélium, mais qu'il prend une part active à sa végétation. Le tréhalose n'est pas, comme on aurait pu le supposer d'après les analyses des deux séries précédentes, une substance de déchet. Cette hypothèse aurait en effet pu être émise, en considérant que sa formation se manifestait toujours au moment où l'autolyse était déjà avancée. Mais cette série en milieu neutre nous montre qu'il se forme dès le début de la végétation et que le maximum est atteint alors que le poids du champignon n'a pas encore beaucoup diminué. Le tréhalose est donc une substance de réserve, mais dont l'évolution est essentiellement différente de celle du mannitol parce qu'elle n'est pas conditionnée par le même facteur. Celle-ci est soumise à la concentration en sucre du liquide, tandis que celle-là ne dépend que du degré d'acidité du milieu. Enfin ces considérations dispensent presque de faire remarquer que ce n'est pas la disparition du mannitol qui détermine la formation du tréhalose mais qu'il s'agit de deux substances entièrement différentes et évoluant chacune pour leur propre compte.

VI. Cultures sur milieu à l'azotate d'ammoniaque et au mannitol.

Nous nous proposons, dans ce chapitre, d'étudier l'évolution des substances contenues dans le *Sterigmatocystis*, quand, au lieu de saccharose, on fournit du mannitol au champignon.

Le liquide de culture employé est le milieu normal, mais les 46 gr. 66 de saccharose par litre sont remplacés par 49 gr. 63 de mannitol qui correspondent au même poids de carbone.

La croissance du mycélium présente, dans ce cas, un certain nombre de variations qu'il est intéressant de signaler. En effet,

lesensemencements étant faits comme d'habitude et l'étuve étant toujours réglée de la même façon, on s'aperçoit qu'à 24 heures la germination n'est pas commencée. C'est seulement à 48 heures que l'on trouve quelques trainées blanches indiquant le début de la végétation. A 72 heures, le liquide est mal couvert par un voile de mycélium cependant assez épais qui commence à fructifier à 80 heures. A 96 heures, on note qu'il épaissit tout en continuant à sporuler. Au cinquième jour, il a à peu près l'aspect et l'épaisseur d'un mycélium de trois jours sur milieu normal. A 6 jours, la sporulation augmente. Il est abondamment fructifié au septième jour. Des spores germent et redonnent presque immédiatement des bouquets de spores grisâtres. De fines gouttelettes noires apparaissent sur la toile mycélienne et principalement sur les bords qui sont décollés du flacon. Ces gouttelettes grossissent et le champignon tend à s'immerger. En résumé la végétation sur mannitol présente les caractéristiques générales de la croissance du mycélium sur milieu normal : mais elle est beaucoup plus lente.

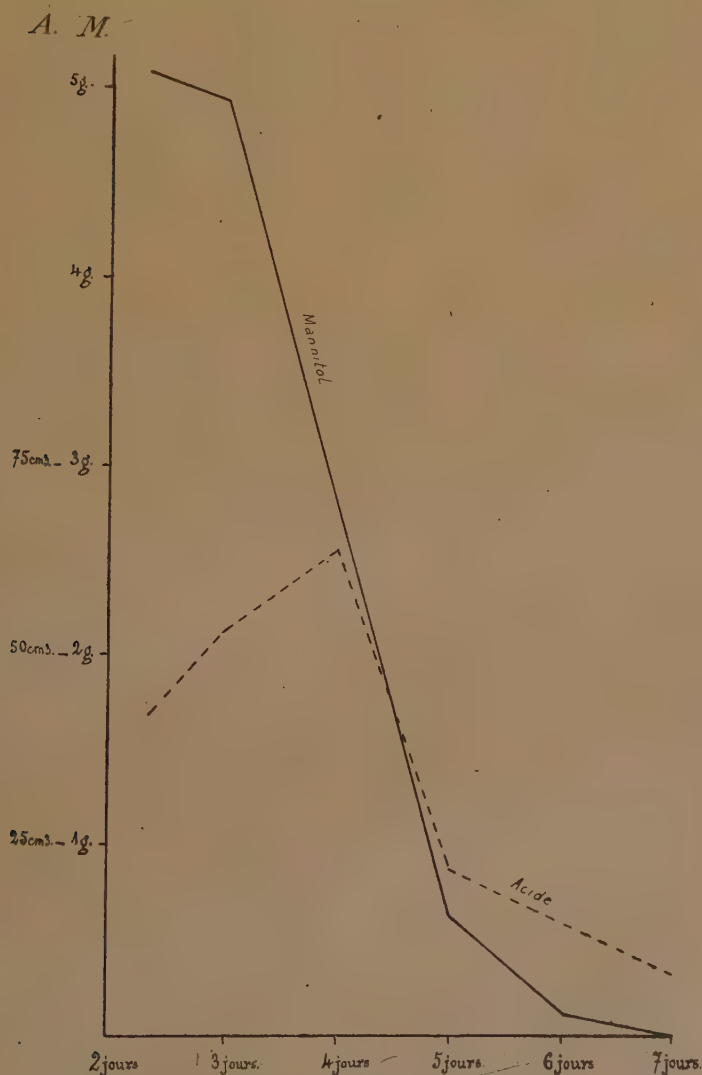
Dans le tableau suivant, nous avons réuni les résultats concernant cette série.

Temps de culture	Liquide de culture		Mycélium		
	Mannitol restant	Acide formé en potasse décinormale	Poids sec du mycélium	Mannitol	Tréhalose
	gr.	cm ³	gr.	gr.	gr.
56 heures	5,09	42	1,052	0,118	0,003
3 jours	4,94	53	1,320	0,146	0,010
4 —	2,69	64	1,931	0,370	0,014
5 —	0,63	22	3,185	0,314	0,124
6 —	0,12	15	2,945	0,215	0,107
7 —	0	8	2,324	0,189	0,104
8 —	0	—	1,939	0,080	0,055

Les graphiques 7 et 8 qui correspondent à ce tableau sont établis de la même façon que les précédents sauf qu'ils commencent à 56 heures, au lieu de 24, et que les points sont séparés par 24 heures, au lieu de 8, en général.

Le mannitol disparaît du liquide suivant une courbe analogue

à celle du sucre en milieu normal. À partir de six jours, il n'y a pour ainsi dire plus de polyol dans le milieu de culture. En même temps que les dosages de mannitol, nous avons effectué la recherche du réducteur. A aucun moment nous n'avons pu



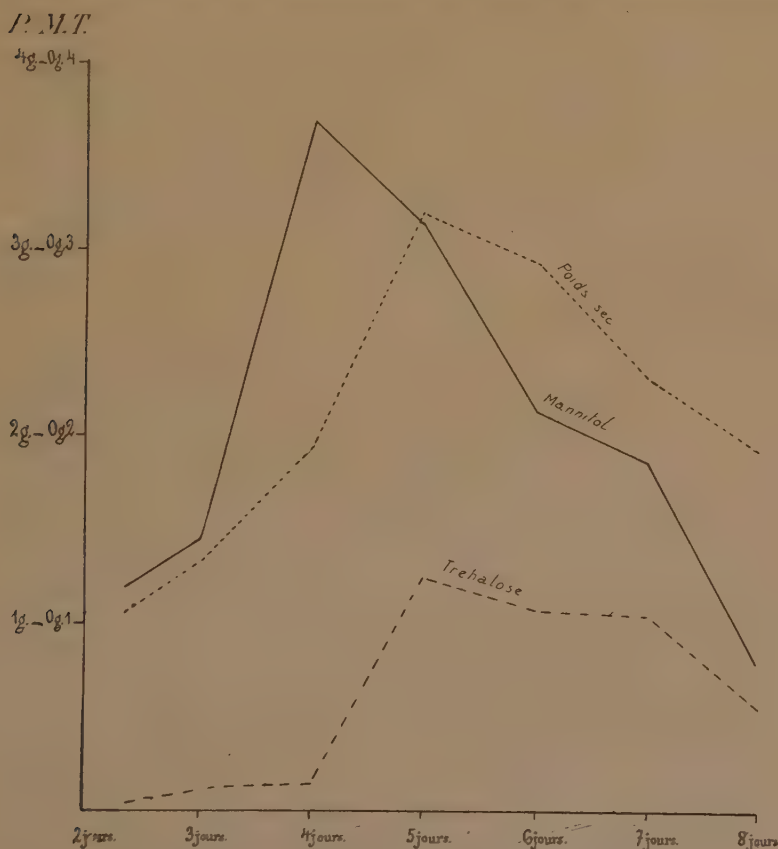
Graphique 7. — Utilisation du mannitol et évolution de l'acidité dans un liquide de culture au mannitol.

en déceler la moindre trace. La disparition du polyol ne s'accompagne donc pas de formation de sucre réducteur. Est-il absorbé en nature ou le stade de réducteur est-il tellement fugace qu'on ne peut le saisir? De nouvelles recherches sont nécessaires pour éclaircir ce point. L'utilisation du mannitol par les spores semble très difficile puisque la germination ne se produit guère avant 48 heures. D'autre part toutes les conidies ne germent pas, puisque le mycélium reste largement fenêtré. Cependant dès 56 heures, il présente le poids notable de 1 gr. 052. Il faut donc en conclure que si la germination est difficile, l'utilisation par les filaments est beaucoup plus rapide. Ces filaments s'accroissent rapidement, forment des cordons qui parcourent le liquide sans le couvrir entièrement. Ils poursuivent cependant leur évolution complète puisque, déjà au bout de trois jours, on les trouve couverts de conidies noires. Pendant ce temps de nouvelles spores ont germé, de nouveaux filaments se sont formés et ont fructifié. Il en résulte que la sporulation débutant à trois jours se poursuit jusqu'à sept jours. Or à trois jours, il y a encore beaucoup de mannitol dans le liquide. La fructification ne nous paraît donc pas étroitement liée à la présence ou à l'absence de l'aliment carboné.

Les quantités d'acide mises en liberté sont comparables à celles qui sont élaborées en milieu normal. Le maximum observé se place ici à quatre jours avec 64 centimètres cubes alors que, sur saccharose, le même maximum de 64 centimètres cubes était atteint à 40 heures. A partir de sept jours, on retrouve la valeur de 8 centimètres cubes que l'on notait à partir de 72 heures dans la première série. En somme, la seule différence consiste en un décalage dans le temps.

Le poids du mycélium, comme nous l'avons vu, est déjà de 1 gr. 052 à 56 heures alors que la germination ne s'effectue guère que peu de temps auparavant. Il s'accroît lentement jusqu'à cinq jours. Nous pensons pouvoir expliquer ce fait par la germination successive des conidies et l'évolution complète de chaque filament formé. Après le cinquième jour, et avant que tout le mannitol soit disparu du liquide, le poids du champignon diminue : l'autolyse commence, et à huit jours elle est à peu près comparable à celle qu'on note à quatre jours en milieu

normal. Le poids maximum est de 3 gr. 185. Il est nettement plus élevé que ceux que nous avons enregistrés sur milieu normal : 2 gr. 448, et sur milieu acide : 2 gr. 465. Par contre il est identique à celui que nous avons noté pour le champignon cul-



Graphique 8. — Evolution du mannitol et du tréhalose dans un mycélium cultivé sur liquide au mannitol.

tivé sur liquide maintenu neutre : 3 gr. 181. La quantité de carbone fournie étant toujours la même, la respiration doit être moins active sur milieu neutre ou mannitolé que dans les autres cas. Nous verrons, dans le dernier chapitre de cette première partie, si l'expérience confirme cette hypothèse.

L'étude du graphique du mannitol contenu dans le mycélium

nous montre une évolution très comparable à celle que nous connaissons déjà. A 56 heures, il y a 0 gr. 118 de polyol par culture. Remarquons qu'à ce moment là teneur en polyol du mycélium est du même ordre que celle que nous avons relevée pour les autres milieux. Sur liquide neutre, on en trouve 0 gr. 133 pour 1 gr. 690 de mycélium alors qu'ici, on en décèle 0 gr. 118 pour 1 gr. 052. Le maximum correspond, comme d'habitude, à l'acidité maxima et précède le développement complet du mycélium, mais il est plus élevé dans cette série que dans toutes les précédentes. Il est en effet de 0 gr. 370 contre 0 gr. 285 en milieu neutre, 0 gr. 157 en milieu acide et 0 gr. 206 en milieu normal. Au moment du maximum, la teneur en mannitol par rapport au poids sec du *Sterigmatocystis* dans cette analyse est beaucoup plus élevée : 18 p. 100 contre 10 p. 100, 6,7 p. 100 et 9,9 p. 100 dans les trois séries précédentes. Le mannitol fourni au *Sterigmatocystis* comme source de carbone se révèle donc comme un aliment favorisant un abondant développement du mycélium et une mise en réserve importante du polyol. Quand la culture présente son poids le plus élevé, la quantité de mannitol a déjà diminué et, au bout de huit jours, nous n'en trouvons plus que 80 milligrammes. Comme dans les cas précédents, l'autolyse n'affecte pas particulièrement la vitesse d'utilisation du polyol.

Le tréhalose ne se forme qu'après quatre jours, c'est à-dire au moment où l'acidité du liquide commence à diminuer. Nous retrouvons là le même phénomène qu'antérieurement. De quatre à cinq jours, l'acidité passe de 64 à 22 centimètres cubes et le tréhalose de 14 à 124 milligrammes par mycélium. Cette quantité reste à peu près stable pendant deux jours, puis l'autolyse finit par faire disparaître la seconde substance de réserve du *Sterigmatocystis*.

Cette série d'analyses vérifie les lois de formation du mannitol et du tréhalose que nous avons établies dans les chapitres précédents. Le fait nouveau mis en évidence est que le mannitol, substance de réserve correspondant au début du développement du mycélium, est un excellent aliment pour le *Sterigmatocystis*, puisque celui-ci atteint un poids plus élevé et qu'il accumule une plus grande quantité de polyol.

VII. Cultures sur azotate d'ammoniaque et un mélange de saccharose et de mannitol.

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que le mannitol est un excellent aliment pour le mycélium mais qu'il ne permet que difficilement la germination des conidies. Dans cette série d'expériences nous avons voulu étudier l'évolution du mannitol contenu dans le liquide quand on fournit aux spores un aliment facilement utilisable pour leur germination. Nous avons choisi le saccharose comme source auxiliaire de carbone. On sait en effet qu'après passage à l'autoclave d'un liquide qui présente une certaine acidité, comme le liquide MOLLIARD, on obtient, au moment de l'ensemencement, un mélange de réducteur et de saccharose. Or le réducteur est directement assimilable par les spores. Les chiffres que nous rapportons ci-dessous permettent de se rendre compte de l'importance de l'énergie immédiatement utilisable offerte aux spores après stérilisation à l'autoclave :

Liquide normal

Acidité pour 150 cm ³ en soude décinormale.	16 cm ³
Réducteur	1 gr. 889
Réducteur + Hydrolysable	6 gr. 686

Liquide au chlorhydrate d'ammoniaque

Acidité pour 150 cm ³ en potasse décinormale .	19 cm ³
Réducteur	1 gr. 824
Réducteur + Hydrolysable	6 gr. 720

La composition du liquide ayant servi à faire ces expériences ne diffère du milieu normal que par l'introduction de 3 gr. 5 de saccharose et de 3 gr. 7 de mannitol par flacon.

Le tableau suivant résume les résultats de cette série :

Temps de culture	Liquide de culture		Mycélium
	Mannitol restant	Sucre restant	Poids sec d'un mycélium
	gr.	gr.	gr.
24 heures.	3,7	2,5	0,472
32 —	2,8	1	1,561
48 —	1,11	0,15	3,015
56 —	0,18	0,04	3,244
72 —	0	0	3,022

Sur le graphique n° 9, correspondant à ce tableau on reconnaît la forme caractéristique de la courbe d'utilisation du sucre. Mais, dans ce cas, elle est plus rapide qu'en milieu normal. A 48 heures, il n'y a déjà presque plus de saccharose dans le liquide et au moment où il a totalement disparu, le poids maximum de la culture est atteint.

Le graphique le plus intéressant est celui de l'évolution du mannitol. Avant 24 heures, on retrouve la quantité de polyol que l'on a introduite. Les spores et les filaments jeunes semblent donc incapables d'utiliser l'alcool polyatomique. A partir de 24 heures, celui-ci disparaît proportionnellement au temps. Sur le graphique, les différents points correspondant aux analyses sont en ligne droite. Ce fait signifie que le mycélium consomme le mannitol avec une vitesse toujours égale, quelle que soit la concentration du produit. Cette propriété semble devoir être rapportée aux filaments ayant déjà pris un certain développement. Or nous avons vu, dans les chapitres précédents, que le mycélium forme du mannitol pendant sa période de croissance rapide : que la source de carbone soit du sucre ou du mannitol. Nous voyons ici qu'en même temps qu'il met ce produit en réserve, il est capable de l'utiliser.

Nous pouvons tirer de cette série d'analyses la conclusion suivante : considérés comme aliments, le saccharose et le mannitol ont des actions complémentaires. En effet le saccharose, ou plutôt le réducteur qui en dérive, forme un potentiel d'énergie immédiatement utilisable par les spores pour leur germi-

nation. Dès que les filaments issus de ces spores ont acquis un certain développement, ils deviennent capables d'utiliser le mannitol qui, à ce moment où le sucre est déjà moins abondant devient leur aliment de choix.

Au contraire du sucre, le mannitol n'est pas consommé proportionnellement à sa concentration, mais la même quantité de polyol disparaît du liquide dans l'unité de temps.

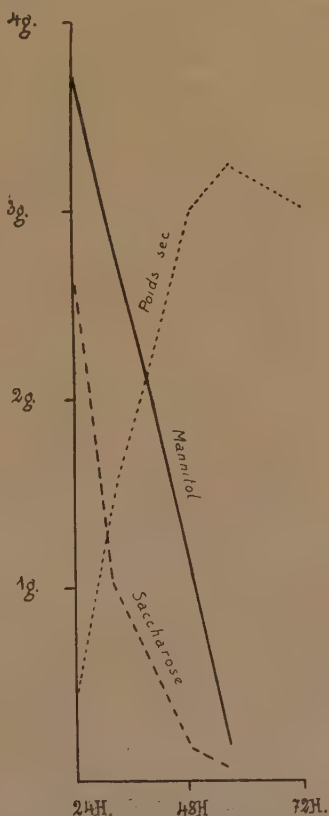
Nous avons établi les analogies et les différences qui existent entre deux sources de carbone et le retentissement de leurs influences sur le mycélium. Nous avons envisagé le mannitol comme aliment et comme constituant cellulaire. Il ne nous reste plus qu'à étudier quelques points de détail qui vont d'ailleurs confirmer nos résultats précédents.

VIII. Etude de la respiration du *Sterigmatocystis*.

Nous avons vu qu'au point de vue de l'évolution des substances contenues dans le liquide de culture, comme de celles existant dans le mycélium, il y a, dans la vie du *Sterigmatocystis*, différentes périodes. L'étude de chacune de

cès substances nous a donné des indications sur la physiologie du champignon à chaque moment, mais l'une des caractéristiques essentielles à considérer consiste dans le dégagement de gaz carbonique par le phénomène respiratoire. Cette étude nous

P.M.S.



Graphique 9. — Utilisation du mannitol et du saccharose dans un liquide contenant un mélange de ces deux corps. Augmentation concomitante du poids du mycélium.

a semblé indispensable pour compléter les recherches que nous avons faites antérieurement.

A. *Technique des expériences de respiration.* — Une fiole conique d'un litre, contenant 150 centimètres cubes² de liquide, estensemencée très largement, après stérilisation à l'autoclave à 120°, avec des spores provenant d'une culture sur pomme de terre vieille de deux à trois semaines. La fiole est bouchée avec un bon bouchon de caoutchouc percé de deux trous dans lesquels sont engagés deux tubes de verre courbés à angle droit. L'un d'eux s'arrête à l'intérieur du flacon, à quelques centimètres au-dessous du bouchon, tandis que le second descend jusqu'à environ 1 centimètre au-dessus du liquide. Des tampons de coton sont introduits dans les tubes et maintenus par deux étranglements faits au chalumeau. La portion des tubes de verre qui se trouvera à l'intérieur du flacon, est stérilisée par chauffage jusqu'à roussissement du coton. Le bouchon est imprégné d'alcool et flambé. Dès que l'alcool est brûlé, on enlève le tampon de coton de la fiole et on le remplace par le bouchon portant son appareil de tubes. Le flaconensemencé et bouché est porté à l'étuve et relié à l'appareil construit de la façon suivante. A l'entrée de l'air extérieur se trouvent quatre tubes en U dont une des branches porte des boules. Nous avons été amené à ajouter une boule supplémentaire sur la branche horizontale de sortie de chaque tube pour éviter les pertes de liquide par projection. Le premier tube contient de l'acide sulfurique à 66°, les deux autres, une solution de potasse caustique à 30 p. 100 ; enfin le dernier, de l'acide sulfurique. A la sortie du flacon, deux tubes à acide sulfurique I et II sont suivis de trois tubes à potasse III, IV et V et la série se termine par deux tubes à acide sulfurique VI et VII.

La pesée de I + II donne la quantité d'eau perdue par la culture. Cette perte est très faible par rapport aux 150 centimètres cubes de liquide contenus dans le flacon. La pesée de III + IV + V donne le poids de gaz carbonique dégagé, V servant de témoin. Mais l'air sec qui traverse les tubes à solution de potasse se charge d'humidité et l'eau est retenue par VI ; VII servant de témoin. Donc le poids de gaz carbonique fixé est représenté par le poids de III + IV + V + VI + VII. D'au-

tre part l'augmentation de poids de VI + VII nous renseigne sur la vitesse du courant d'air, car la concentration de la potasse restant sensiblement constante pendant tout le cours de l'expérience, par suite du remplacement fréquent des solutions, le courant d'air toujours sec qui traverse ces solutions se charge d'eau proportionnellement à sa vitesse. De cette façon nous avons pu homogénéiser les vitesses du courant gazeux dans les différentes expériences.

La sortie du tube VII est reliée à une trompe à eau tirant à plein rendement sur un réservoir, formant volant, d'un litre de capacité. Une pince permet de régler la vitesse de passage de l'air. Il faut prendre des précautions lors de la mise en route et de l'arrêt de l'appareil pour éviter les mélanges de potasse caustique et d'acide sulfurique concentré.

B. *Respiration du Sterigmatocystis sur milieu normal.* — Au point de vue morphologique, on peut faire un certain nombre de remarques sur la culture en expérience. A 24 heures, le mycélium forme un voile continu assez épais. Dès le troisième jour, il sporule, puis la fructification se complète. Au bout de huit jours, des gouttelettes de liquide noir, dont nous avons plusieurs fois signalé l'existence, font leur apparition, puis le mycélium tend à s'immerger. L'expérience est arrêtée à ce moment.

Le liquide de culture a été analysé avant la mise en route de l'appareil. La quantité de sucre trouvée, après intervention par la sucrase, a été de 6 gr. 686. L'acidité exprimée en soude décinormale était au début de 16 centimètres cubes. A la fin de l'expérience, le réducteur a totalement disparu et les acides sont indosables par suite de la forte coloration du liquide.

Les quantités de gaz carbonique dégagées sont exprimées en milligrammes dans le tableau suivant. L'intensité de la respiration est mesurée par le quotient du gaz carbonique dégagé par le nombre d'heures compris entre deux mesures. Les valeurs ainsi obtenues figurent dans la troisième colonne.

Temps de culture	Gaz carbonique dégagé	$\frac{CO}{T}$
8 heures	0 mgr.	—
24	266	16
32 30	1.035	90
48 30	2.343	82
55 45	2.896	76
71 45	3.939	65
79 15	4.320	50
96 15	4.995	39
104 15	5.363	46 =
120 30	5.738	30
127 15	5.968	34 =
143 45	6.333	22
168	6.599	10
192 15	6.786	7
216 45	6.870	3
240 15	6.940	2

Sur la courbe du liquide normal de la figure 10, qui est la traduction graphique de ce tableau, on remarque que de 24 à 48 heures le dégagement de gaz carbonique croît à peu près proportionnellement au temps puisque les points 24, 32 et 48 sont presque en ligne droite. Or nous savons que c'est pendant cette période qu'il y a beaucoup de sucre dans le liquide, que la quantité d'acide augmente et que le mannitol se forme suivant un graphique très comparable à celui du dégagement de gaz carbonique. De 48 à 72 heures, le coefficient $\frac{CO^2}{T}$ diminue nettement et cependant nous savons que le poids du mycélium augmente. La quantité de sucre existant dans le liquide devient très faible et le mannitol est utilisé. Au delà de 72 heures, dans la période de sporulation qui va de 72 à 96 heures, l'intensité de la respiration décroît encore. Le sucre a totalement disparu du liquide. Après 96 heures, commence l'autolyse et le dégagement de gaz carbonique devient de moins en moins intense. A partir de 240 heures, on peut considérer qu'il est presque nul, puisqu'il n'est plus que de deux milligrammes à l'heure.

Au total, la quantité de gaz carbonique émise est de 6 gr. 940 pour une consommation de 6 gr. 686 de sucre. MOLLIARD [32] opérant dans des conditions sensiblement identiques donne pour 7 grammes de saccharose un poids d'environ 7 gr. 1 de CO^2 .

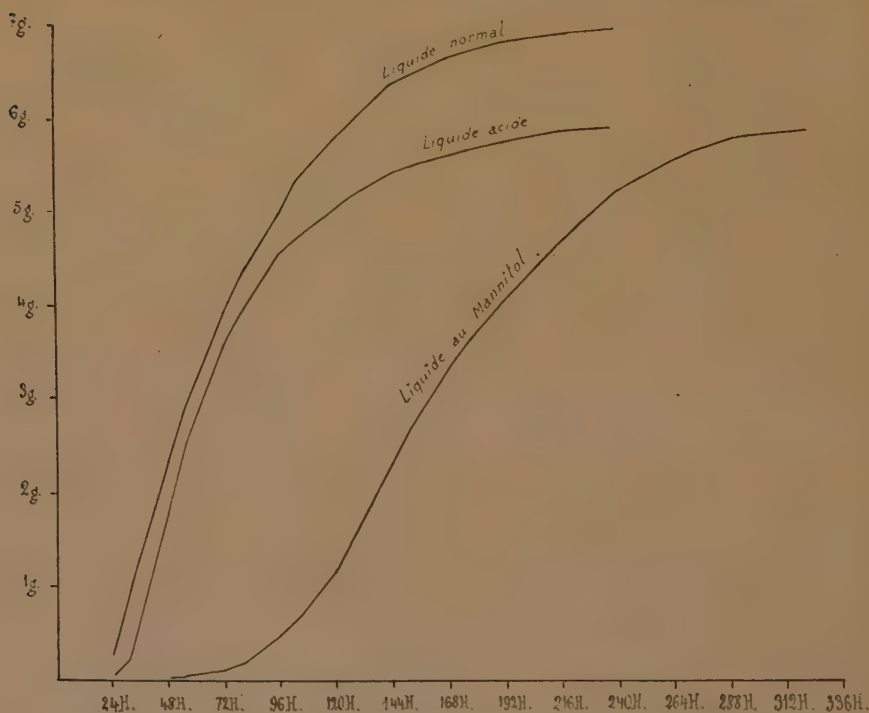
C. *Respiration du Sterigmatocystis sur milieu acide.* — Les remarques que l'on peut faire sur la végétation du mycélium sur le milieu au chlorhydrate d'ammoniaque sont comparables à celles que nous venons de rappeler, sauf que le mycélium ne fructifie pas et qu'il n'a pas de tendance à s'immerger.

Le liquide de culture contient la même quantité de sucre que dans l'expérience précédente, soit 6 gr. 686. L'acidité exprimée en potasse décimale est, avant culture, de 19 centimètres cubes. Après culture, on la trouve égale à 93 centimètres cubes.

Les résultats des mesures sont figurés dans le tableau suivant.

Temps de culture	Gaz carbonique dégagé	$\frac{\text{CO}^2}{T}$
—	—	—
8 heures	1 mgr.	—
24 15	38	2
32	217	23
48 15	1.767	95
56 30	2.534	93
72	3.568	66
79 15	3.934	50
95 45	4.515	35
102 45	4.689	25
119	5.018	19
126 45	5.179	20 =
143 45	5.363	10
152 15	5.466	12 =
167 15	5.578	7
175 15	5.634	7 =
192	5.720	5
217	5.820	4
238 45	5.895	3

Dans la figure 10, ce tableau correspond au liquide acide. Nous avons vu, à propos des cultures sur milieu normal et sur milieu acide, que le poids sec du mycélium, au début de la végétation à 24 et à 32 heures, était plus faible sur milieu acide que sur milieu normal. L'étude de la respiration confirme ces



Graphique 10. — Emission de gaz carbonique par trois mycéliums, cultivés l'un sur liquide normal, le second sur liquide acide et le troisième sur liquide au mannitol.

résultats. A 32 heures, il n'a été dégagé que 217 milligrammes de gaz carbonique contre 1.035 dans l'expérience précédente. Les poids correspondants des mycéliums figurant dans les deux tableaux précités sont de 1 gr. 083 contre 1 gr. 442. Donc au début, la végétation est réellement moins active sur liquide acide que sur liquide normal. Ensuite, en considérant le coefficient $\frac{\text{CO}_2}{\text{I}}$, nous voyons qu'il atteint et même dépasse le coeffi-

cient obtenu dans le tableau précédent. La courbe actuelle devient parallèle à la courbe précédente mais garde son décalage initial. A partir de 72 heures, le parallélisme cesse d'exister ; c'est qu'un phénomène important dans la vie du mycélium ne se produit pas dans ce cas : la fructification. Le mycélium réduit rapidement son dégagement gazeux. A 240 heures on peut considérer que nous nous trouvons au même stade de l'évolution du *Sterigmatocystis* que précédemment, puisque le gaz carbonique émis à l'heure n'est plus que de trois milligrammes.

Dans les deux tableaux que nous venons d'étudier on peut remarquer que la courbe que l'on pourrait tracer avec les valeurs de $\frac{\text{CO}_2}{T}$ présenterait des ressauts dans la portion descendante. En effet sur milieu normal, de 96 à 104 heures, le dégagement gazeux horaire est de 46 milligrammes alors que, dans la période précédente, allant de 79 à 96 heures, il n'était que de 39 milligrammes. De même de 120 à 127 heures il atteint 34 milligrammes contre 30 dans la période 104 à 120 heures. Sur milieu acide, le coefficient est de 20, de 119 à 126 heures contre 19, de 102 à 119 heures. Il atteint 12, de 143 à 152 heures contre 10, de 126 à 143 heures. Enfin la valeur 7 correspondant à la période 167-175 heures est également aberrante entre les chiffres 7 et 5 des périodes précédant et suivant celle-là. La signification de ces anomalies est la suivante : à la lumière pendant l'autolyse, le dégagement de gaz carbonique est plus intense qu'à l'obscurité ; en effet un espace de huit heures entre deux points correspond à des mesures faites à 9 heures et à 17 heures, tandis qu'un temps de 16 heures correspond à des pesées effectuées à 17 heures et à 9 heures. Cette simple remarque que l'on peut tirer de nos expériences nécessiterait d'autres recherches pour l'analyse des causes déterminantes réelles.

D. *Respiration du Sterigmatocystis sur milieu mannitolé.* —

L'aspect morphologique du mycélium aux différents moments de sa végétation a été décrit à propos des analyses des cultures sur mannitol et azotate d'ammoniaque. Rappelons brièvement les principaux stades. A 24 heures, la germination n'est pas commencée. A 48 heures, elle s'effectue, mais le liquide n'est

pas encore couvert, quelques flocons blancs de place en place indiquent les débuts du mycélium. Au bout du troisième jour, le liquide est mal couvert par un voile très friable. Huit heures plus tard, on note que le champignon fructifie à mesure qu'il se développe. A quatre jours il épaissit et fructifie. Puis la sporulation augmente progressivement. Au bout de huit jours, des gouttelettes apparaissent sur la toile mycélienne. Les bords se décollent du flacon et le mycélium tend à s'immerger.

Dans le liquide de culture analysé avant l'ensemencement on a décelé 6 gr. 721 de mannitol et 15 centimètres cubes d'acide exprimé en soude décinormale. Après culture, on n'a plus retrouvé de polyol et les acides n'ont plus été dosables par suite de la coloration due à l'aspergilline.

Le tableau suivant résume les mesures effectuées.

Temps de culture	Gaz carbonique dégagé	$\frac{CO^2}{T}$
—	—	—
23 heures	0 mgr.	—
47	10	0,4
55	29	2
71 15	100	4
79 15	179	10
95 15	449	16
103 15	640	24
119 15	1.162	32
127 15	1.514	44
143 30	2.265	46
151 15	2.677	53
167 30	3.335	40
175	3.578	32
191 45	4.033	27
215 30	4.648	25
224 15	4.847	22
241 15	5.201	20
248	5.331	19

Temps de culture	Gaz carbonique dégagé	$\frac{\text{CO}_2}{T}$
264 heures	5.541 mgr.	13
271 30	5.615	9
287 45	5.726	6
295 45	5.763	4
311 30	5.814	3
319 30	5.834	2

La courbe du liquide au mannitol (figure 10) qui correspond à ce tableau est différente des deux précédentes. On remarque d'abord la lenteur du début de la végétation. Jusqu'à 80 heures, la quantité de gaz carbonique dégagée est bien faible et cependant nous savons qu'au bout de trois jours le poids du mycélium atteint environ 1 gr. 3 et que 2 grammes de mannitol sont disparus du milieu. Après trois jours, le dégagement gazeux devient plus important, cependant il n'atteint jamais les valeurs élevées obtenues dans les autres cas. Le maximum relevé est en effet de 53 milligrammes à l'heure, contre 90 en milieu normal, et 93 en milieu acide. Nous savons qu'après six jours il n'y a pour ainsi dire plus de polyol dans le liquide. A ce moment, l'émission de gaz carbonique commence à diminuer. La décroissance du coefficient $\frac{\text{CO}_2}{T}$ est très

progressive et ce n'est qu'au bout de 13 jours que sa valeur atteint 3 milligrammes alors que, dans les deux expériences précédentes, ce même chiffre était obtenu en 10 jours.

E. *Conclusions des expériences de respiration.* — La première courbe nous montre qu'à partir de 48 heures, la vitesse de dégagement du gaz carbonique diminue. A ce moment, nous savons qu'il y a encore du sucre dans le liquide et que le poids maximum n'est pas encore atteint, mais nous avons vu également que le mannitol mis en réserve commence à être utilisé. La période des oxydations les plus intenses correspond à celle où l'on trouve le maximum de sucre dans le liquide. Pendant l'autolyse, le mycélium brûlant sa propre substance réduit sa respiration.

La seconde courbe présente les mêmes phénomènes. Mais la

troisième montre que le mycélium peut se former avec un dégagement de gaz carbonique moins intense que dans les cas précédents. Comparons en effet les nombres portés dans le tableau suivant et qui représentent l'émission de gaz carbonique correspondant au poids maximum des cultures :

	Poids sec maximum du mycélium	Gaz carbonique émis au moment où le poids sec maximum est atteint
Culture sur milieu normal . .	2 gr. 448	3 gr. 939
Culture sur milieu acide . .	2 gr. 465	3 gr. 568
Culture sur milieu mannitolé.	3 gr. 185	1 gr. 162

Nous constatons que le poids de gaz carbonique dégagé va en diminuant alors que le poids du mycélium subit une variation inverse. A ce moment, presque tous les glucides présents dans les liquides ont disparu. Il faut donc supposer que l'utilisation du mannitol ne se fait pas de la même façon que le réducteur et qu'elle donne lieu à des oxydations beaucoup moins intenses. Cependant le poids du mycélium étant plus considérable, on peut supposer que le carbone utilisé se retrouve dans le champignon. Nous savons en effet par ailleurs que la quantité de carbone présente dans un *Sterigmatocystis* est très peu influencée par les variations externes et qu'elle est voisine de 47 p. 100. Il n'en va plus de même si nous considérons le moment où les cultures ont été interrompues. Nous pouvons, avec les chiffres enregistrés, dresser un tableau comparable au précédent.

	Poids sec du mycélium	Totalité du gaz carbonique émis
Culture sur milieu normal . .	1 gr. 779	6 gr. 940
Culture sur milieu acide . .	2 gr. 378	5 gr. 895
Culture sur milieu mannitolé.	1 gr. 701	5 gr. 834

Les deux premières cultures suivent la règle que nous avons établie à partir des nombres du premier tableau : le carbone qui n'a pas été rejeté par la seconde culture se retrouve dans le

mycélium, comparativement à la première. Mais la troisième fait exception. Elle présente, à la fois, le poids le plus faible et le plus petit dégagement de gaz carbonique. L'hypothèse la plus plausible consiste à admettre que, pendant la période d'autolyse, des oxydations peu intenses aboutissent à la formation de substances de déchet carbonées plus importantes que dans les autres cultures, et que l'on doit retrouver dans le liquide. Si cette hypothèse, que nous nous proposons de vérifier ultérieurement ne se révélait pas exacte, il faudrait penser qu'un autre gaz que le gaz carbonique a été rejeté par le champignon et que ce fait constitue une cause d'erreurs dans nos expériences.

RECHERCHES SUR L'ÉVOLUTION DU MANNITOL DANS LE CÉLERI (*APIUM GRAVEOLENS* L.)

I. Préparation, propriétés physiques et chimiques, dosage.

Le mannitol existe chez un grand nombre de végétaux supérieurs. Industriellement on l'extrait de la manne du Frêne (*Fraxinus ornus* et *F. rotundifolia*). Classiquement le matériel commode pour le mettre en évidence est le tubercule du Céleri. Citons, à ce propos, le mode de préparation indiqué dans le traité de Physiologie végétale de M. MOLLIARD [31] : « des coupes de tubercules de Céleri traitées par l'alcool, puis abandonnées à une évaporation lente donnent naissance, sur les bords de la lamelle, à des cristaux orthorhombiques, ayant le plus souvent la forme d'aiguilles groupées d'une manière radiaire ». MOLISCH [30] décele le mannitol de la façon suivante : il pratique une coupe à l'automne ou en hiver, après la chute des feuilles, dans un bourgeon de Lilas (*Syringa vulgaris* L.). Des gouttelettes se rassemblent en une goutte à la surface de la coupe. Cette goutte en se desséchant laisse cristalliser le mannitol.

Pour obtenir une quantité de polyol suffisante pour permettre la caractérisation par les méthodes habituelles, on procède à l'épuisement du tubercule de Céleri, en ayant soin d'éliminer le plus possible des substances qui nuiraient à sa cristallisation. On prend un certain poids de tubercules de Céleris, 7 à 800 grammes, par exemple, que l'on découpe en petits fragments et que l'on fixe par l'alcool bouillant à 95° sous réfrigérant ascendant. Au bout d'un quart d'heure d'ébullition, la masse est jetée sur une toile filtrante, les fragments de tubercules sont recueillis et broyés à la machine. La pulpe ainsi obtenue est épuisée à trois reprises différentes par l'alcool à 80°, sous réfrigérant ascendant. Tous les liquides, de fixation et d'épuisement, sont réunis et distillés sur le vide, au bain-marie. Quand le jus

est arrivé à l'état d'extrait mou, on le reprend par l'eau distillée, puis on traite par le sous-acétate de plomb. Le plomb est éliminé par précipitation à l'état de sulfure par l'hydrogène sulfuré. Le sulfure de plomb est retenu sur filtre plat et l'excès d'hydrogène sulfuré et l'acide acétique formé, sont chassés par chauffage au bain-marie. On laisse évaporer le jus jusqu'à consistance sirupeuse, puis on abandonne le sirop à la cristallisation. Celle-ci débute assez rapidement. On la laisse se poursuivre pendant deux à trois jours. Quand on la juge complète, on jette la masse cristalline sur un filtre plat, on essore les cristaux dans du papier filtre et on les traite par de l'alcool bouillant en quantité suffisante pour les dissoudre en totalité. Par refroidissement, la cristallisation se produit. En général il suffit de filtrer le liquide pour obtenir des cristaux de mannitol pur. Cependant on peut procéder à une nouvelle cristallisation dans l'eau. On obtient ainsi environ 1 gramme de cristaux qui suffit pour permettre d'effectuer les réactions caractéristiques du mannitol.

Le corps ainsi obtenu n'a pas présenté de pouvoir réducteur par la méthode de BERTRAND.

L'étude du pouvoir rotatoire par la méthode de BADREAU que nous avons exposée à propos du *Sterigmatocystis*, a donné les résultats suivants :

0 gr. 15 de cristaux séchés à la température ordinaire sont dissous dans 20 centimètres cubes d'eau distillée. Cette solution est amenée à 50 centimètres cubes par addition de liqueur arsenicale. La déviation obtenue au tube de 3 décimètres est de $+ 41^{\circ}7$, moyenne de six lectures. Le calcul donne pour cette déviation 0 gr. 148. Ce résultat correspond à 1,5 p. 100 près, à celui que l'on doit obtenir si les cristaux dont on est parti sont bien ceux du mannitol. Or cette différence est tout à fait de l'ordre de grandeur des erreurs de lecture polarimétrique.

Le point de fusion est établi au bloc MAQUENNE. Il est d'abord mesuré sur du mannitol du commerce, qui nous donne 163° . Celui que nous avons préparé fond entre 164 et 165° . Le mélange des deux corps présente un point de fusion intermédiaire entre les deux précédents. Le mannitol du commerce, provenant du Frêne est donc identique à celui du Céleri.

Le filtrat, reliquat de la cristallisation, contient du sucre réducteur et du saccharose. On décèle le premier par la liqueur de FEHLING, et le second par la même méthode, après avoir soumis le liquide à l'action de l'invertine. Le pouvoir rotatoire avant et après hydrolyse, et d'autre part le pouvoir réducteur après hydrolyse, en tenant compte du réducteur existant précédemment, montrent que le corps contenu dans le jus est du saccharose. D'ailleurs sa présence dans le céleri a déjà été signalée par CHARPENTIER [15] qui en a trouvé 2 gr. 552 p. 100 de substance fraîche.

Nos recherches porteront sur ces trois corps et en particulier sur l'évolution du mannitol dans ses rapports avec le saccharose et le réducteur.

La première partie du dosage consiste en un épuisement des tissus à étudier. On part autant que possible de 100 grammes de substance fraîche. Il est presque inutile de s'occuper du poids sec, que nous avons cependant établi pour chaque organe, à chaque analyse. Nous rapporterons les résultats à 100 grammes de tissus vivants.

Les 100 grammes de tubercules sont découpés en petits fragments puis fixés par l'alcool à 95° bouillant, au bain-marie, sous réfrigérant ascendant. Les fragments sont ensuite broyés à la machine et la pulpe est épuisée, trois fois de suite, par de l'alcool à 80° bouillant, dans les mêmes conditions que précédemment. La quantité d'alcool employée pour la fixation et l'épuisement de 100 grammes de substance est au total d'environ un litre et demi. Dans ces conditions on extrait tous les sucres de la pulpe. L'alcool est ensuite distillé dans le vide, pour éviter de porter le liquide à une température trop forte, qui favoriserait l'hydrolyse de certaines substances, notamment du saccharose. L'extrait est repris par l'eau, et déséqué par le sous-acétate de plomb. Le précipité est retenu sur filtre plat, remis en suspension dans l'eau distillée pour lavage, et filtré à nouveau. Le filtrat est traité par le carbonate de soude, comme dans le cas des analyses de *Sterigmatocystis*. Le précipité de carbonate de plomb rassemblé sur un filtre est lavé à l'eau distillée. L'eau de lavage est réunie au filtrat précédent dans une éprouvette graduée et le volume final est noté.

Le dosage proprement dit porte sur le réducteur, l'hydrolysable et le mannitol. Nous avons vu antérieurement la façon de procéder au dosage du réducteur et du mannitol. Il nous reste à exposer le dosage de l'hydrolysable, qui est du saccharose. On peut le faire par hydrolyse à l'acide, ou à la sucrase. Cette seconde méthode plus lente que la première nous semble préférable et c'est celle que nous avons toujours employée. On prend 40 centimètres cubes de liqueur, on ajoute une goutte de phénolphthaléine et on neutralise l'excès de carbonate de soude par l'acide acétique, en dépassant légèrement la neutralité. On ajoute ensuite 4 centimètres cubes de sucrase et un peu de toluène. La fiole est fermée solidement et portée à l'étuve. Quelques heures suffisent pour l'intervention totale du saccharose. Mais, pour ne pas avoir d'essais à faire, on abandonne la fiole à l'étuve à 34-33° jusqu'au lendemain. Le liquide est filtré. Il est inutile de noter le volume final qui doit être identique au volume initial puisque nous avons opéré en vase clos, et que le toluène ne passant pas à la filtration sur filtre mouillé, n'intervient pas pour modifier la quantité totale de liquide. Le dosage est ensuite fait par la méthode de G. BERTRAND.

II. Evolution du mannitol dans le limbe des feuilles.

Le Céleri présente trois parties distinctes : les limbes, les pétioles ou les tiges, le tubercule. Nous avons cru logique de commencer par exposer les résultats obtenus sur les limbes que nous avons été amené à considérer comme le lieu de formation du mannitol. Nous étudierons ensuite l'évolution du polyol dans les pétioles et les tiges, puis dans le tubercule. Par des expériences nous essaierons enfin de confirmer les résultats obtenus précédemment.

Nos recherches ont porté sur *Apium graveolens* L., variété horticole appelée « Céleri rave de Paris amélioré ». Les cultures sont faites en pleine terre, à partir de plantules provenant de semis sur couches et remises en place définitive. La plante étant bisannuelle, pendant la première année, elle forme des feuilles et un tubercule et, au cours de la seconde année, il se développe une tige, des feuilles et des fleurs. Le seul point

délicat de cette culture consiste dans la conservation des tubercules pendant l'hiver. Nous avons essayé plusieurs méthodes avant de nous arrêter à la suivante. A la fin de la première année, immédiatement avant les gelées, on couvre les plantes avec des châssis, qu'on laisse ouverts pendant la journée et que l'on ferme la nuit. De cette façon, les Céleris se conservent en bon état et, au moment de la reprise de la végétation, on constate que le déchet n'atteint pas 10 p. 100.

Suivant que l'on considère un Céleri de première ou de seconde année, on constate que les feuilles présentent des différences morphologiques assez considérables. Dans le premier cas, les limbes sont relativement larges et d'un vert foncé, les pétioles prennent un important développement. Dans le second, au contraire, les limbes sont beaucoup plus petits, d'un vert plus pâle et sont reliés à la tige par de petits pétioles courts et minces. L'aspect des deux plantes est donc très différent. Ces variations nous ont conduit à mesurer la surface des limbes, c'est-à-dire la surface assimilatrice, pensant que des modifications aussi importantes dans la taille devaient déterminer des réactions physiologiques.

Méthode de mesure de la surface assimilatrice. — Les feuilles d'un pied de Céleri sont récoltées et pesées. On choisit une ou deux feuilles moyennes dont on sépare les limbes. On les pèse dans un flacon à tare à bouchon rodé, pour éviter l'évaporation et on fait la même opération sur les pétioles correspondants. On mesure la surface représentée par ces limbes de la façon suivante. Sur la glace d'un châssis-presse photographique on étale toutes les folioles, on les recouvre d'une feuille de papier au bromure d'argent et on expose à la lumière artificielle. De cette façon on obtient, par développement de la feuille de papier, le contour des limbes. On fait sécher la photographie, on la mesure et on la pèse. On découpe les folioles suivant leurs contours imprimés et on pèse ces découpures. On obtient ainsi rapidement tous les éléments du calcul de la surface foliaire.

Le tableau suivant donne les poids frais et la surface assimilatrice des pieds de Céleri correspondant aux analyses effectuées.

Date de la récolte	Surface foliaire	Poids frais
	dm ²	gr.
19 juin	1,85	4
27 juin	2,13	5
4 août	12,84	30
23 août	21,95	68
7 septembre	17,89	43
22 septembre	22,52	64
8 octobre	21,07	58
29 octobre	34,98	105
28 novembre	30,18	86
9 janvier	5,25	16

Ce tableau permet de suivre l'évolution du bouquet foliaire. Du 19 juin au 23 août, il s'accroît d'une façon continue. Du 23 août au 8 octobre, la surface foliaire se maintient à peu près constante. Or, pendant cette seconde période, le temps a été constamment froid et pluvieux : il s'est produit un véritable arrêt de la végétation. Le mois d'octobre au contraire, a été très ensoleillé et nous voyons passer la surface assimilatrice de 21 à 34 décimètres carrés. Après le 28 novembre commence la période hivernale, pendant laquelle les plantes sont mises sous châssis. L'importance du bouquet foliaire est considérablement réduite. Pendant tout l'hiver, le Céleri garde les mêmes feuilles qui deviennent d'un vert foncé, puis, au printemps suivant, il commence à pousser des feuilles nouvelles, morphologiquement comparables aux précédentes et enfin une tige se différencie. Cette tige porte elle-même les petites feuilles dont nous parlions plus haut. A ce moment, la surface des limbes augmente à nouveau mais elle n'atteint pas une valeur aussi élevée qu'au cours de la première année.

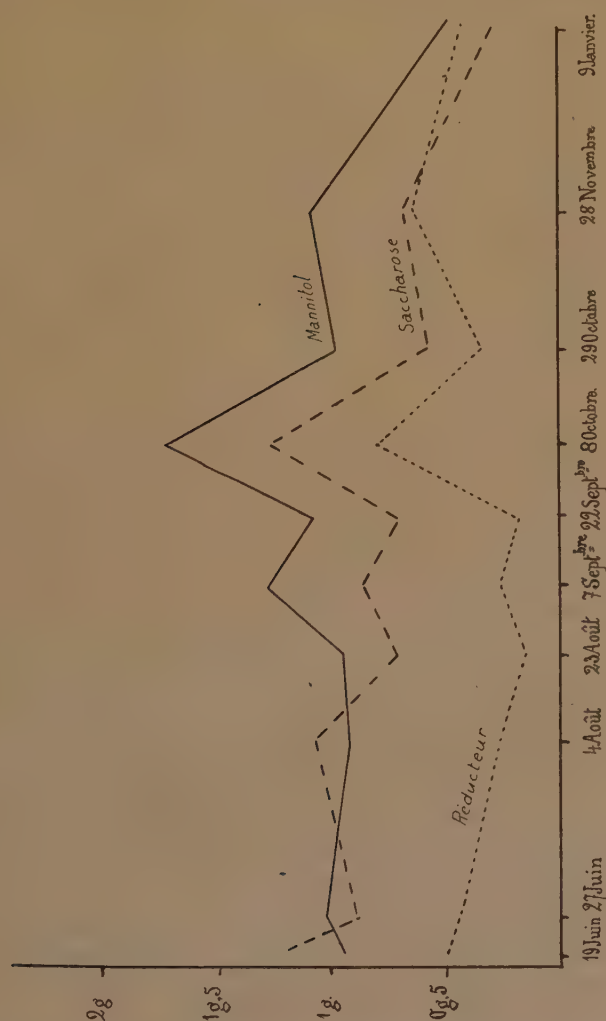
Les analyses ont porté sur le mannitol, le saccharose et le réducteur, suivant les méthodes que nous avons exposées. En général la totalité des limbes a été utilisée. Dans les premières expériences, il a été pris vingt plantules. Dans tous les cas, les résultats sont rapportés à 100 grammes de poids frais.

Date de la récolte	Mannitol	Saccharose	Réducteur
	gr.	gr.	gr.
19 juin	0,946	1,200	0,484
27 juin	1,024	0,882	0,428
4 août	0,921	1,066	0,267
23 août	0,955	0,723	0,148
7 septembre	1,286	0,865	0,265
22 septembre	1,095	0,706	0,183
8 octobre	1,725	1,279	0,800
29 octobre	0,974	0,576	0,349
28 novembre	1,101	0,695	0,639
9 janvier	0,500	0,280	0,415

Les nombres de ce tableau ont servi à établir le graphique n° 11.

La teneur des limbes en mannitol ne subit pas de modifications très importantes. Dans la première partie du graphique, qui va du 19 juin au 23 août, la quantité de polyol est absolument stable, aux erreurs d'expérience près : le taux est voisin de 1 p. 100. Or nous nous trouvons dans une période très active de la végétation puisque la surface foliaire passe de 1 dm² 85 à 21 dm² 95. Le poids des limbes subit une augmentation du même ordre, de 4 grammes à 68 grammes. La quantité absolue de polyol existant dans les feuilles d'un pied de Céleri croît donc en même temps que le poids de ces organes. Comme le poids des limbes et la surface assimilatrice ont une évolution parallèle, la formation du mannitol est en définitive proportionnelle à cette surface assimilatrice. Ce fait permet déjà de penser qu'il y a un rapport étroit entre l'assimilation chlorophyllienne et la formation du mannitol. Le 7 septembre, nous trouvons une quantité de polyol un peu plus forte, mais le 22, elle est de nouveau voisine de 1 p. 100. Au moment de la nouvelle période ensoleillée qui commence au début d'octobre, le taux du mannitol augmente rapidement et atteint son maximum avec 1 gr. 725 p. 100. Immédiatement après ce maximum qui se place au 8 octobre, nous assistons à un développement considérable du bouquet foliaire puisque le 29 octobre il atteint une surface de près de 35 décimètres carrés. Ultérieurement le taux du polyol redevient égal à 1 p. 100, pour décroître

pendant l'hiver. Le 9 janvier, on ne trouve plus que 0 gr. 500 de mannitol dans 100 grammes de limbes. Pendant toute la période froide, la teneur en mannitol présente quelques varia-



Graphique 14. — Evolution du mannitol, du saccharose et du réducteur dans les limbes du Céleri.

tions. Au mois de juin nous la retrouvons au voisinage de 0,9 p. 100.

L'étude que nous venons de faire du graphique du polyol suggère la remarque suivante : tout se passe comme si ce corps

était fabriqué dans les limbes. L'argument en faveur de cette hypothèse est tiré de ce fait que les variations de la teneur en mannitol, pendant toute la belle saison, sont peu importantes. Dans ces conditions on peut supposer, puisque les fixations sont toujours faites le soir à la même heure, que la quantité de polyol trouvée représente la fabrication de la journée et que, pendant la nuit, elle sera évacuée par les pétioles vers la souche. Au moment où les conditions deviennent plus favorables pour la végétation, la teneur en polyol augmente considérablement, mais dès que de nouvelles feuilles se sont développées, on retrouve le même taux qu'auparavant. Autrement dit : la fabrication vers le 8 octobre dépasse les possibilités de conduction et d'emmagasinement, mais dès que celles-ci augmentent, par le fait du développement de toute la plante et notamment de la souche et des pétioles, l'évacuation du polyol redevient régulière et la teneur des limbes reprend sa valeur. Enfin, pendant l'hiver, la végétation de la partie aérienne de la plante devenant très peu active, la quantité de mannitol formée diminue.

L'étude du saccharose montre que cette substance subit des variations parallèles à celles du polyol. Au début on trouve une valeur voisine de 1 p. 100. A partir du 23 août se manifeste un décalage du graphique qui sera définitif, mais, dès ce moment, les graphiques du mannitol et du saccharose deviennent absolument parallèles. La similitude des variations de ces deux substances fait penser, soit que l'une dépend directement de l'autre, soit que toutes deux ont une communauté d'origine. Ces observations ne permettent pas de répondre avec sécurité à cette question. Nous verrons, dans la partie expérimentale, si une solution définitive peut être proposée.

On trouve du réducteur dans les limbes. Il a une évolution sensiblement comparable à celle des autres produits. Nous n'avons pas abordé l'étude de son origine, mais ses variations parallèles à celles du saccharose, et d'autre part sa quantité faible par rapport à ce corps, correspondent aux phénomènes que l'on a étudiés dans les limbes des autres plantes et pour lesquels on a admis qu'il provenait de l'hydrolyse du saccharose dans la cellule elle-même.

III. Evolution du mannitol dans les pétioles et la tige.

Pendant la première année de sa végétation, le Céleri présente un bouquet foliaire composé de limbes et de pétioles. Au début de la seconde année, il se développe une tige qui porte des feuilles pétiolées, puis des fleurs et des fruits. Or si, morphologiquement et anatomiquement, les pétioles du début sont très différents de la tige, au point de vue physiologique, on peut confondre ces deux organes. Nous les avons donc réunis dans nos analyses pour les opposer en bloc aux limbes.

Le poids frais des pétioles présente des variations assez importantes suivant les individus considérés et la date de la récolte : 19 juin, 3 grammes ; 27 juin, 8 grammes ; 4 août, 37 grammes ; 23 août, 93 grammes ; 7 septembre, 58 grammes ; 22 septembre, 93 grammes ; 8 octobre, 76 grammes ; 29 octobre, 128 grammes ; 28 novembre, 101 grammes ; 9 janvier, 26 grammes. Cependant nous reconnaissons, dans cette énumération de nombres, les différentes phases de la végétation que nous avons signalées à propos des limbes. Au début, du 19 juin au 23 août, le poids s'accroît régulièrement. L'arrêt du 23 août au 8 octobre se manifeste pour les pétioles comme pour les limbes. Il est suivi d'une reprise : le maximum est atteint le 29 octobre. Du 28 novembre au 9 janvier, la disparition progressive d'un certain nombre de feuilles entraîne la diminution du poids des pétioles. Pendant l'hiver, les variations sont peu importantes et, au mois de mars, la reprise de la végétation se caractérisant par la formation d'une tige, le poids subit une nouvelle augmentation.

Toutes les analyses sont faites sur la totalité des pétioles d'une plante, sauf dans les trois premiers cas où il a été pris plusieurs individus. Les résultats sont rapportés à 100 grammes de poids frais dans le tableau suivant :

Date de la récolte	Mannitol	Saccharose	Réducteur
	gr.	gr.	gr.
19 juin	0,830	0,194	0,392
27 juin	1,281	0,261	0,469
4 août	2,000	0,216	0,459
23 août	1,905	0,149	0,340

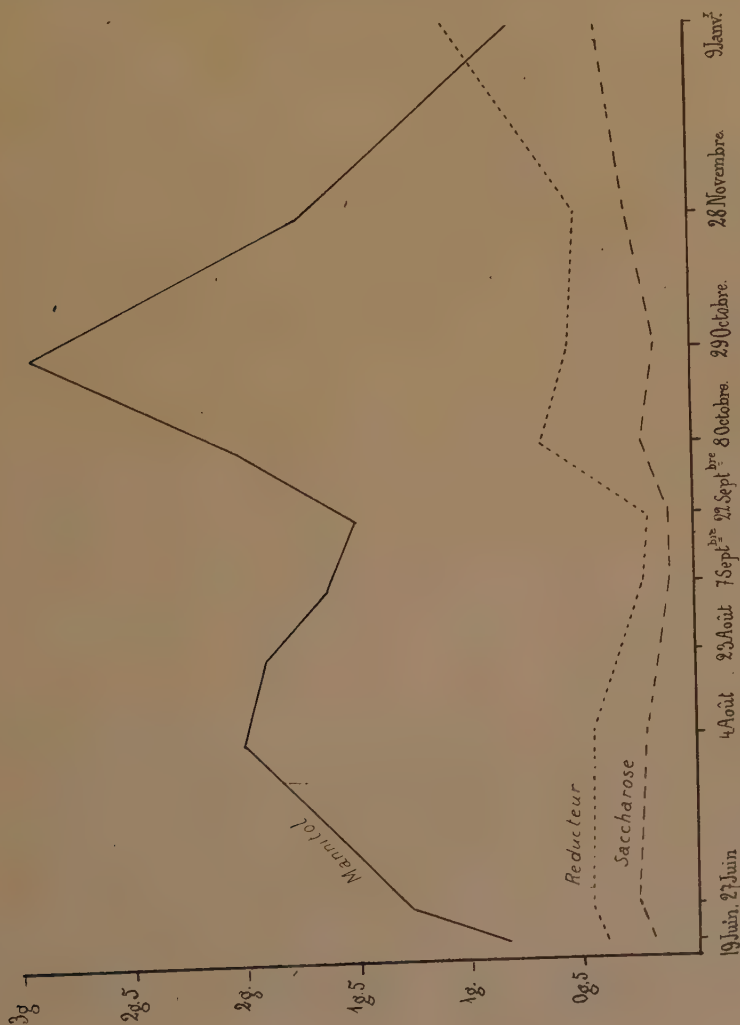
Date de la récolte	Mannitol	Saccharose	Réducteur
	gr.	gr.	gr.
7 septembre	1,629	0,115	0,231
22 septembre	1,508	0,109	0,202
8 octobre	2,030	0,233	0,689
29 octobre	2,932	0,169	0,551
28 novembre	1,736	0,292	0,509
9 janvier	0,805	0,405	1,077
6 juillet	1,665	0,565	0,770

Les nombres de ce tableau ont servi à établir le graphique n° 12.

L'étude du mannitol au cours de la première année montre que, contrairement à ce qui se passe pour les limbes, ce produit s'accumule dans les pétioles. L'accroissement de la teneur en polyol est très rapide au début, puis se ralentit. Mais alors que, dans les limbes, le taux de 1 p. 100 est invariable pendant toute cette période, dans les pétioles il est passé de 1 à 2 p. 100. Cette accumulation de mannitol nous amène à penser que les pétioles jouent un rôle de réservoir pour cette substance. Cependant le 23 août, nous constatons une diminution de la teneur. Ce réservoir est donc à niveau variable. On met beaucoup mieux ce fait en évidence en rapportant la quantité de polyol, non plus à 100 grammes de poids frais, mais à la totalité des pétioles d'une plante. Cette façon de procéder est valable pour les quatre premières analyses, car elles ont été effectuées sur plusieurs individus. Le 19 et le 27 juin on a pris 10 pieds, le 4 et le 23 août, 4. Les résultats correspondant à des moyennes, on peut estimer que, dans ces conditions, les différences individuelles sont atténuées et que les nombres trouvés traduisent exactement les variations du corps considéré dans une plante moyenne, ou, ce qui revient au même, dans l'ensemble de la culture à un moment donné. Dans ces conditions, on obtient les nombres suivants pour le mannitol :

	gr.
19 juin	0,044
27 juin	0,088
4 août	0,745
23 août	0,317

Nous voyons que, dans la période du 19 au 27 juin, les pétioles d'une plante se sont enrichis de 0 gr. 044 de mannitol. Dans



Graphique 42. — Evolution du mannitol, du saccharose et du réducteur dans les pétioles de Céleri.

la période du 27 juin au 4 août, pour un espace de temps à peine cinq fois plus long, l'augmentation a été 15 fois plus considérable. Puis en 19 jours, la moitié environ de la quantité totale du polyol est disparue. Il y a des irrégularités qu'il est

difficile d'expliquer si l'on admet que les pétioles sont un lieu de formation pour cette substance. Car dans cette période de vie très active pour la plante, une production aussi discontinue, suivie d'une utilisation immédiate semble bien peu probable. Le Céleri construit ses réserves à cette époque, il ne les utilise pas. En prenant l'hypothèse opposée : les pétioles ne sont qu'un lieu de passage et d'accumulation momentanée pour le mannitol, on comprend beaucoup mieux l'évolution de cette substance. Le polyol délivré aux pétioles est évacué dans un autre organe, le tubercule, dans la mesure où celui-ci est apte à le recevoir. Dans le cas contraire, il s'accumule. Nous verrons, en étudiant le tubercule, que la comparaison du graphique de cet organe avec celui des pétioles rend cette hypothèse très vraisemblable.

A partir du 23 août, les analyses portant uniquement sur les pétioles d'un pied, il n'est plus possible de tirer une règle générale d'un cas particulier. On constate que la teneur diminue le 7 septembre, pour atteindre une valeur encore plus faible le 22 septembre. La période du 22 septembre au 29 octobre est marquée par la reprise de la végétation que nous avons déjà signalée. Or, pendant ce temps, nous constatons une augmentation considérable de la teneur en mannitol. Au 29 octobre, on arrive au maximum avec 2 gr. 932 pour 100 de poids frais.

Après le 28 octobre la teneur en polyol décroît rapidement et atteint au 9 janvier la valeur de 0 gr. 8. Durant cette période, le poids des pétioles diminue également, par conséquent les pétioles sont au total, bien pauvres en mannitol à ce moment. Pendant l'hiver, plusieurs feuilles se détachent, et la végétation du Céleri se ralentit d'une façon générale. A ce moment la quantité de mannitol contenue dans les pétioles reste assez faible, et ne reprend jamais une grande importance au cours de la seconde année. Au mois de juin, par exemple, on en trouve 1 gr. 06 p. 100 de poids frais.

L'étude du saccharose montre que cette substance est toujours en faible quantité dans les pétioles. Les variations qu'elle subit sont peu importantes. Au début nous trouvons une teneur en saccharose voisine de 0 gr. 2. A partir du 4 août, ce taux va en décroissant régulièrement, pour atteindre une valeur de 0 gr. 1

au 22 septembre, suivant en cela l'évolution du mannitol. En effet c'est du 4 août au 22 septembre que se manifeste l'arrêt de la végétation. A la reprise, la teneur en saccharose augmente et atteint de nouveau 0 gr. 2. Nous avons vu que l'accroissement du mannitol était considérable dans le même temps. Puis la quantité de saccharose augmente pendant l'hiver : 0 gr. 3 au 28 novembre, 0 gr. 4 au 9 janvier. La question des rapports entre le polyol et le saccharose se pose à propos de ce graphique. Du 27 juin au 4 août, le mannitol augmente, le saccharose diminue, du 4 août au 22 septembre tous deux diminuent. Du 22 septembre au 29 octobre, il y a un accroissement de la teneur des deux substances. A partir du 29 octobre, on constate une augmentation du saccharose et une diminution du polyol. Au total, pendant deux périodes, l'évolution est parallèle et, pendant deux autres, elle est inverse. Qu'en conclure ? Il faut bien admettre qu'il y a vraisemblablement une indépendance totale de ces deux corps, qui évoluent chacun pour leur propre compte. Or nous savons que le saccharose dans les pétioles n'est pas une substance fixe, mais qu'il subit une hydrolyse qui l'amène à l'état de réducteur, et ceci, progressivement, à mesure que l'on s'éloigne du limbe. Si l'on admet que le mannitol est très stable et qu'il est transporté en nature, on pourra comprendre que les variations de ces deux substances sont indépendantes, même si elles proviennent toutes deux de la même fonction, de l'assimilation chlorophyllienne par exemple. Après le 9 janvier, nous atteignons un maximum pour le saccharose : au 31 janvier, nous notons 0 gr. 370. Au cours de la seconde année, la teneur diminue un peu et reste ensuite à peu près stable : le 6 juillet, on trouve 0 gr. 563.

La quantité de réducteur est toujours plus considérable que celle de saccharose mais les variations des deux substances sont parallèles entre elles. Nous retrouvons ici les caractéristiques générales des pétioles qui ont été étudiées dans beaucoup de plantes et dans la Betterave en particulier : alors que, dans les limbes, et surtout dans la racine, le saccharose prédomine sur le réducteur, dans les pétioles c'est le phénomène inverse que l'on observe. Remarquons que, pendant l'hiver, l'augmentation du réducteur est plus considérable que celle du saccharose.

Au total, durant cette période, hydrolysable + réducteur subissent un accroissement que n'explique pas l'assimilation chlorophyllienne puisqu'à ce moment elle est très réduite. Cette augmentation est contemporaine d'une diminution du mannitol, mais nous avons vu que, dans d'autres cas, c'est le phénomène inverse qui se produit, et que, par conséquent nous ne pouvons en tirer aucune conclusion. Nous constaterons, dans la racine, des faits analogues : ce qui nous amène à penser que ce phénomène n'est pas fortuit.

En résumé, on peut penser que le mannitol constitue une réserve importante pour les pétioles, puisque parmi les trois substances que nous avons étudiées, c'est la plus abondamment représentée. Mais la mise en réserve par ces organes n'est que temporaire. Elle est conditionnée à la fois par le développement foliaire et par l'accroissement de la racine. Il faut donc, au point de vue du polyol, considérer surtout les pétioles comme un lieu de passage compris entre la production et l'emmagasinement.

Evolution du mannitol dans le tubercule.

Le tubercule de Céleri se forme au cours de la première année, atteint son développement maximum au mois de novembre, passe l'hiver sans subir de modifications morphologiques importantes, se vide et se creuse de cavités pendant la seconde année.

Au moment de la première analyse, le 19 juin, les racines des 20 pieds prélevés pèsent ensemble 64 grammes, ce qui correspond à un poids de 3 gr. 2 par racine. La seconde analyse faite le 27 juin montre que le poids moyen de la souche est de 5 grammes. Le 4 août, il atteint 36 grammes ; le 23, 111 grammes ; le 7 septembre, 128 grammes ; le 22, 205 grammes ; le 8 octobre, 270 grammes ; le 29, 330 grammes ; le 28 novembre, 410 grammes. Ce poids de 400 grammes correspond aux plus gros tubercules que nous ayons obtenus au cours de cette série. Les racines ne grossissant plus dans la période suivante, nous les avons choisies aussi identiques que possible. Leur poids frais oscillait assez peu autour de 300 grammes.

Nous avons d'ailleurs vérifié qu'une variation considérable de poids n'apportait pas une perturbation du même ordre dans la teneur en mannitol, en saccharose et en réducteur. On trouvera ci-après les résultats de deux analyses qui ont été faites dans ce but de contrôle. Le 28 novembre, deux tubercules ont été déplantés. Ils ont été choisis parmi les types extrêmes. L'un pèse 410 grammes et l'autre 177. La différence de poids est donc de plus du simple au double. Les résultats figurent dans le tableau suivant.

Tubercule I (410 gr.) Tubercule II (177 gr.)

Mannitol p. 100 gr. de poids

frais	2 gr. 433	2 gr. 084
Réducteur	0 gr. 063	0 gr. 050
Saccharose	1 gr. 737	1 gr. 974
Substance sèche	12 gr. 740	13 gr. 300

On voit par conséquent que si des tubercules aussi dissimilaires présentent dans leur constitution des variations qui ne sont pas négligeables, on peut facilement, en choisissant les exemplaires, réduire à peu de chose les différences quantitatives que nous venons d'observer. Ceci nous amène à considérer comme comparables deux racines dont les poids ne diffèrent pas de plus de 50 grammes.

Des analyses ont été faites, pendant la période de formation du tubercule, puis durant tout l'hiver, ce qui nous permettra de suivre l'évolution des substances pendant la période de vie ralentie. Enfin une autre série effectuée pendant la formation de la tige, des feuilles et des fleurs nous fera assister à l'utilisation des réserves. Les analyses dont nous donnons ci-dessous les résultats correspondent donc à l'ensemble de l'évolution du tubercule depuis le moment où il se présente à l'état de racine filiforme, jusqu'au moment où, creux et cotonneux, il s'est vidé, pour permettre la floraison et la fructification.

Dans le tableau suivant les quantités de mannitol, de saccharose et de réducteur sont exprimées en grammes pour 100 grammes de poids frais du tubercule.

Date de la récolte.	Mannitol	Saccharose	Réducteur
	gr.	gr.	gr.
19 juin.	0,415	0,460	0,165
27 juin.	0,520	0,425	0,130
4 août.	1,545	0,667	0,081
23 août.	2,119	1,150	0,030
7 septembre	2,590	0,398	0,028
22 septembre . . .	1,675	0,454	0,036
8 octobre	1,713	0,800	0,052
29 octobre	1,976	0,893	0,049
28 novembre. . .	2,433	1,737	0,063
9 janvier.	1,860	2,365	0,110
31 janvier.	1,455	2,989	0,082
18 février.	1,611	2,523	0,060
12 mars	1,340	2,468	0,040
29 mars	1,618	2,014	0,040
18 avril	1,470	1,624	0,050
7 mai.	1,587	1,943	0,081
30 mai.	1,548	1,081	0,035
16 juin.	1,205	0,585	0,010
6 juillet	0,952	0,301	0,028
22 juillet	0,583	0,112	0,056
3 septembre. . . .	0,084	0,042	0,018

Ces nombres ont servi à établir les graphiques 13 et 14.

Considérons d'abord l'évolution du mannitol. Le graphique de cette substance, vu dans son ensemble, présente plusieurs tronçons nettement différents. Le premier va du 19 juin au 7 septembre, le second du 7 septembre au 22 septembre, le troisième du 22 septembre au 28 novembre, le quatrième du 28 novembre au 31 janvier, le cinquième du 31 janvier au 30 mai et le dernier du 30 mai au 3 septembre.

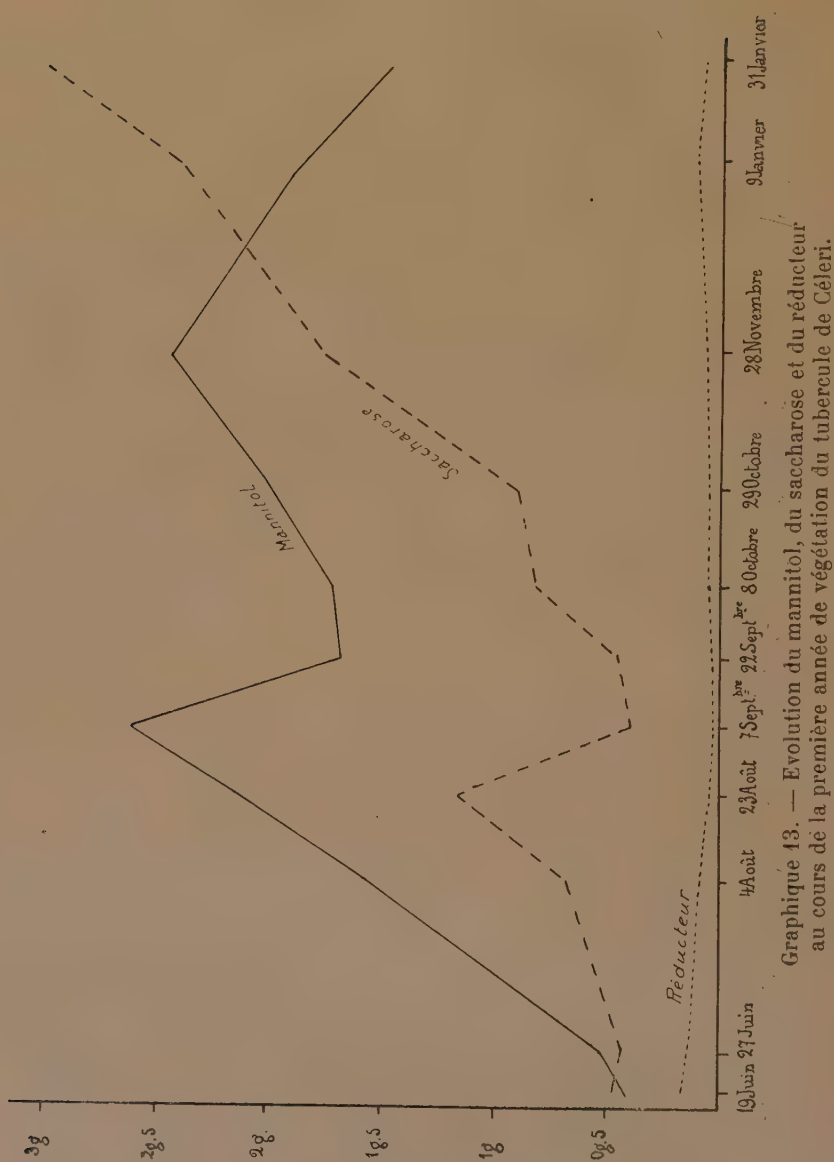
Dans la première partie, on assiste à une augmentation régulière, en fonction du temps, de la teneur en mannitol. Le graphique est à peu de chose près, une droite partant d'une valeur faible, qui ne sera de nouveau atteinte que peu de temps avant la mort de la plante, pour arriver à un maximum. Si nous comparons ces résultats au poids de la souche pendant la même période, nous voyons qu'elle a augmenté de 125 grammes en

deux mois et demi, alors que, dans le mois suivant, elle passe de 128 à 270 grammes, ce qui correspond à une augmentation de 142 grammes. Par conséquent, dans cette première partie, la teneur en mannitol s'accroît, malgré une importante formation de tissus nouveaux. Si nous voulons avoir une idée plus frappante de l'accumulation du polyol dans la racine, nous pouvons considérer les poids de cette substance rapportés à un individu, comme nous l'avons fait pour les pétioles. Ce mode de présentation est valable pour les quatre premières analyses, parce que celles-ci ont été effectuées sur plusieurs individus : 20, le 19 juin ; 30, le 27 juin. La totalité du matériel a été fixée et analysée. Dans le troisième et le quatrième cas, on a pris 100 grammes parmi les 124 et les 444 grammes représentant le poids frais total des quatre Céleris utilisés chaque fois. Nous nous trouvons donc dans des conditions telles que les différences individuelles sont atténuées et les résultats rapportés à un individu peuvent être considérés comme valables pour caractériser l'évolution d'une plante type. On obtient de la sorte les nombres suivants pour le mannitol.

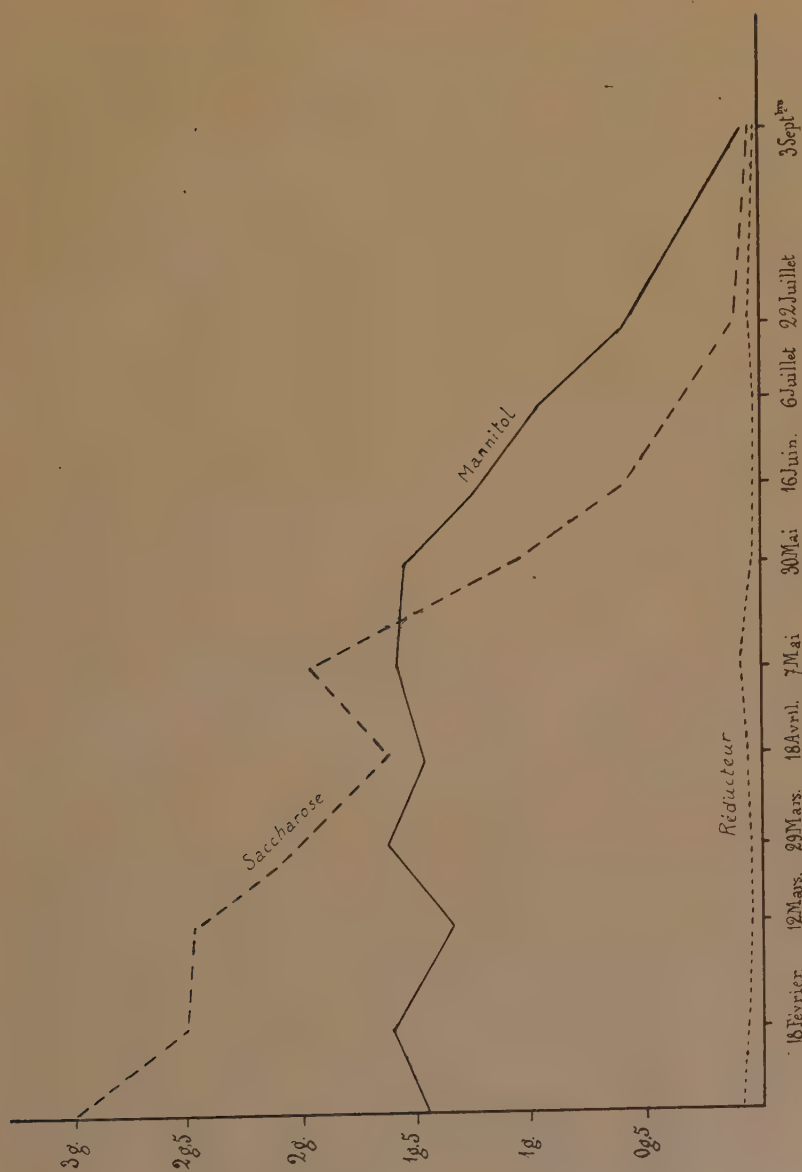
	gr.
19 juin	0,012
27 juin	0,023
4 août	0,540
23 août	2,331

On se rend bien compte, d'après ces nombres, de l'importance de l'accroissement du mannitol au début de la végétation de la racine du Céleri.

Si nous comparons cette première partie du graphique à la portion correspondante représentant l'évolution de la même substance dans les pétioles, nous remarquons immédiatement certaines analogies. Dans les deux cas, la teneur en polyol augmente. Cependant l'accroissement est bien plus régulier dans la racine que dans les pétioles et elle atteint également une valeur plus élevée dans le premier organe. D'autre part le maximum, pour le mannitol du tubercule, se place au 7 septembre alors que le taux de 2 grammes est atteint dès le 4 août dans les pétioles, et que du 4 août au 7 septembre sa



valeur diminue. En nous reportant à la courbe correspondante établie pour les limbes, nous pouvons caractériser, de la façon suivante, l'allure générale des trois graphiques : dans les lim-



Graphique 14. — Evolution du mannitol, du saccharose et du réducteur au cours de la seconde année de végétation du tubercule de Céleri.

bes, la teneur en mannitol est constante, dans les pétioles elle subit des fluctuations, l'augmentation étant suivie d'une diminution, tandis que, pendant le même temps, dans le tuber-

cule, elle s'accroît sans interruption. Ces constatations nous conduisent à émettre l'hypothèse suivante sur l'évolution du mannitol dans le Céleri : formé dans les limbes, il s'accumule d'une façon temporaire dans les pétioles et se met définitivement en réserve dans le tubercule.

Dans la seconde partie du graphique qui va du 7 au 22 septembre, nous assistons à une diminution de la teneur en polyol. Le poids du tubercule, pendant cette quinzaine, augmente considérablement, passant de 128 à 205 grammes. Dans le cas présent, rapporter les résultats à 100 grammes de poids frais, ne conduit pas à une interprétation exacte des phénomènes physiologiques qui se passent dans la racine, car on voit, sur le graphique, que la teneur en polyol diminue. Mais si le développement de la cellulose est plus rapide que l'accumulation du mannitol, cela ne veut pas dire que ce corps disparaisse. Le poids de la souche du 22 septembre se trouvant compris entre ceux des racines du 7 septembre et du 8 octobre, on peut admettre que l'individu considéré se trouve dans la moyenne et on est autorisé à calculer la quantité de polyol existant dans le tubercule total. Celui du 7 septembre en contient 3 gr. 3, celui du 22, 3 gr. 4. Aux erreurs d'expérience près, ces valeurs sont identiques. Nous assistons donc à un arrêt de l'accumulation du mannitol et non à l'utilisation de celui-ci. Or nous avons vu que, pendant cette période, le Céleri subit un ralentissement dans sa végétation : la surface assimilatrice n'augmente pas, le poids des pétioles est stable. Nous avons expliqué cet arrêt par un abaissement de température et une diminution générale de la luminosité, par suite de pluies continuelles. Ce n'est qu'au mois d'octobre que les conditions extérieures devenant plus favorables, la végétation reprend son cours, avec une augmentation de la surface foliaire et un accroissement du poids des pétioles.

Dans la troisième période qui va du 22 septembre au 28 novembre, nous assistons à une ascension régulière du graphique. Le tubercule atteint son poids maximum le 28 novembre. A partir du moment où les individus sont adultes, on ne peut plus comparer entre elles les quantités absolues de polyol qu'ils contiennent, car c'est à ce moment que les différences

individuelles prennent toute leur importance. La représentation sous forme de teneur pour 100 est donc la seule possible, quoiqu'elle ne soit pas parfaite. Le 8 octobre, le poids du tubercule ayant beaucoup augmenté, la quantité de polyol qu'il renferme est en réalité plus considérable que ne le montre le graphique, qui cependant manifeste une reprise traduisant le sens du phénomène. La comparaison avec le graphique des pétioles montre les mêmes particularités que dans la première partie : augmentation suivie de diminution. Remarquons que le maximum pour les pétioles se place au 29 octobre alors que la valeur élevée de 2 gr. 433 ne se trouve, dans la souche, que le 28 novembre. A cette époque, comme précédemment, le maximum de la teneur en mannitol est atteint dans les pétioles avant le maximum correspondant dans le tubercule. Le graphique des limbes montre au 8 octobre une accumulation de polyol dans ces organes, bientôt suivie d'une diminution qui ramène le taux à sa valeur initiale de 1 p. 100. Cette troisième période peut se comprendre de la façon suivante au point de vue de l'évolution du polyol dans l'ensemble du Céleri : par suite des conditions extérieures devenues plus favorables, la teneur en mannitol augmente d'une façon imprévue dans les limbes ; dans les pétioles, l'accroissement est encore plus rapide, mais dès que le tubercule a pris un grand développement, le taux du polyol diminue dans ces organes, tandis que l'accumulation du produit est continue et régulière dans la souche.

Dans la quatrième partie du graphique, qui va du 28 novembre au 31 janvier, nous voyons la teneur en mannitol du tubercule diminuer d'une façon régulière. Nous nous trouvons, à ce moment, dans la période hivernale qui marque un temps de repos pour l'appareil foliaire, alors qu'un travail chimique important se produit dans la racine. Pendant l'hiver, le tubercule ne varie pas sensiblement de poids : l'abaissement du taux du polyol correspond donc bien à une disparition réelle de ce corps de l'organe considéré. L'interprétation de ce fait est très délicate à cause de la difficulté de l'expérimentation. Y a-t-il utilisation du polyol ou transformation en une autre substance ? Toutes les hypothèses que nous pourrions émettre sont gratuites et d'autres recherches seront nécessaires pour élucider ce

point. Nous pouvons simplement remarquer que la diminution du mannitol est générale dans toute la plante. On peut supposer que, par suite du ralentissement de l'assimilation chlorophyllienne, le taux de 1 p. 100 trouvé précédemment dans les limbes ne peut être maintenu, car les pétioles sont susceptibles d'évacuer vers la racine des quantités de polyol supérieures à celles qui sont formées. Le même raisonnement est applicable aux pétioles pour expliquer leur teneur plus faible en mannitol. Si un autre phénomène n'intervenait pas à ce moment dans la racine, on devrait voir augmenter d'une façon faible, mais continue, la quantité de polyol : or c'est le contraire qui se produit.

Du 31 janvier au 30 mai, le graphique forme un plateau. Cette ligne horizontale est coupée de crochets qui correspondent aux différences individuelles. Alors que la teneur en mannitol reste stable, il se passe, dans cette période, des phénomènes physiologiques importants. Jusqu'au 29 mars, la plante présente une rosette de feuilles dont la surface assimilatrice, faible, ne varie pas beaucoup. Mais à partir de cette date, on note que de nouvelles feuilles se forment et qu'une tige commence à se développer. La plante entre dans sa seconde année, pendant laquelle elle va fleurir et fructifier. Peu à peu les feuilles d'hiver tombent, la tige s'allonge, porte des feuilles et, pendant le mois de mai, des fleurs en bouton apparaissent. Or, durant tout ce temps, la quantité de mannitol ne varie pas. Tout se passe donc comme si l'alcool polyatomique contenu dans la racine ne prenait pas part à l'édification des tissus jeunes.

Après le 30 mai, commence la dernière partie du graphique, qui va jusqu'à la mort de la plante. Nous assistons à une décroissance régulière de la teneur en polyol. Or il se produit à ce moment un phénomène inverse de celui que nous avons signalé au début de la première année : le poids du mannitol existant dans une souche diminue plus vite que ne l'indique le graphique parce que le tubercule se creuse de cavités, se réduisant en poids et en volume. Au point de vue physiologique, on note que, le 16 juin, la floraison est très abondante. Après le 6 juillet, la plante présente des graines qui mûrissent lente-

ment. Le mannitol n'est donc utilisé que tout à fait à la fin de la végétation.

Considérons maintenant l'évolution du saccharose. Au début de la première année, le tubercule n'en contient que très peu. L'accroissement de cette substance est lent, que l'on considère l'augmentation pour 100 grammes de poids frais ou pour un individu. En effet, dans la période où ce calcul est possible, on voit que, dans un tubercule, le poids de saccharose est le suivant aux différents moments :

	gr.
19 juin	0,013
27 juin	0,021
4 août	0,216
23 août	1,221

Alors que le 19 juin les poids de saccharose et de mannitol sont identiques, le 23 août celui du sucre est deux fois plus faible. Par conséquent quand le tubercule s'accroît rapidement, il forme surtout du mannitol. Nous avons constaté à propos du *Sterigmatocystis* un phénomène absolument analogue. A partir du 23 août, le graphique du sucre présente un fléchissement qui est parallèle à celui qui se produit pour le polyol du 7 au 22 septembre, mais qui est très différent dans sa nature et dans son interprétation. En effet il y a une disparition réelle du sucre de la souche : puisqu'en calculant par individu on en trouve 1 gr. 2 le 23 août et 0 gr. 5 le 7 septembre. Au contraire, comme nous l'avons vu antérieurement, du 7 au 22 septembre, la teneur décroissante du mannitol correspond en réalité à un palier dans l'accroissement de cette substance, si on rapporte les données de l'analyse à un pied. Le ralentissement de la végétation qui commence à la fin du mois d'août retentit immédiatement sur le saccharose qui est utilisé sans retard, tandis que la même cause provoque, avec un léger décalage, un simple arrêt dans l'accumulation du polyol. Le saccharose se comporte donc comme une substance de réserve plastique immédiatement utilisable tandis que le mannitol est beaucoup plus stable.

A partir du 7 septembre, nous assistons de nouveau à une

augmentation du sucre dans la racine. Au 22 septembre, le tubercule a grossi et au total il contient 0 gr. 9 de saccharose. Au 8 octobre, la reprise est très nette puisque nous en trouvons 2 gr. 1. La quantité absolue de sucre est peu importante à cette époque, comparativement à celle du polyol. Cependant les deux graphiques ont la même allure avec un décalage par précession pour le saccharose.

Du 28 novembre au 31 janvier, il se passe pour le sucre un phénomène inverse de celui que nous avons signalé pour le polyol. La teneur en saccharose augmente régulièrement et atteint son maximum au 31 janvier. De même que la disparition du mannitol pendant ce même temps est inexplicable, de même, si l'on admet que le saccharose du tubercule provient de l'assimilation chlorophyllienne, on ne comprend pas pourquoi il s'accumule alors que la surface foliaire est très diminuée et que les conditions extérieures sont telles que la chlorophylle ne fonctionne que très peu. La disparition du mannitol coïncidant dans le temps avec l'apparition du saccharose, on peut être tenté de supposer qu'il y a une relation directe entre ces deux évolutions contraires. Nous ne pouvons pas vérifier cette hypothèse à propos du Céleri. Cependant il n'est pas inutile de rappeler un fait analogue que nous avons observé chez le *Sterigmatocystis*. En milieu normal, la moisissure forme, dans les 48 premières heures, une certaine quantité de mannitol, qui disparaît ensuite pendant que le tréhalose augmente. Le saccharose du Céleri n'est certes pas identique au tréhalose du Champignon, mais ces deux substances présentent néanmoins certaines analogies, puisqu'on a pu appeler le tréhalose, « le saccharose des champignons ». Or dans le *Sterigmatocystis*, nous avons montré que l'évolution des deux substances de réserve est totalement indépendante l'une de l'autre malgré que, dans les conditions normales, un rapprochement semble possible. Dans le cas du Céleri, on ne peut que considérer ce qui se passe dans la nature. Il n'est pas facile d'intervenir, par l'expérimentation, sur le tubercule. Nous sommes tenté d'admettre que ce que nous avons démontré pour le *Sterigmatocystis* est valable pour le Céleri, c'est-à-dire que le sucre est indépendant du polyol.

Après le 31 janvier, le tubercule présente de moins en moins de sucre. La disparition du saccharose est progressive et régulière et, à la fin de la végétation, il n'y en a pour ainsi dire plus. On ne retrouve pas, dans ce graphique, le reflet des événements physiologiques qui se passent dans la plante au cours de la seconde année.

Le réducteur est toujours très peu important dans le tubercule. Au point de vue de l'évolution de cette substance, on peut faire un rapprochement entre la Betterave et le Céleri. En effet, dans la plante que nous étudions, le rapport du réducteur au saccharose est plus grand au début de la végétation et diminue ensuite progressivement. Comparons nos résultats à ceux qu'a publiés COLIN dans son mémoire sur le saccharose dans la Betterave [16].

Etat des Betteraves analysées	Sucres pour 100 gr. de pulpe fraîche		Rapport $\frac{\text{Réducteur}}{\text{Saccharose}}$
	Réducteur	Saccharose	
Souches filiformes	0,46	2,57	0,171
— de 4 à 6 gr.	0,25	5	0,050
— de 10 à 15 gr.	0,20	7,42	0,026
— de 100 à 150 gr.	0,22	9,45	0,023
— de 150 à 200 gr.	0,13	11,70	0,011

Etat des Céleris analysés	Sucres pour 100 gr. de pulpe fraîche		Rapport $\frac{\text{Réducteur}}{\text{Saccharose}}$
	Réducteur	Saccharose	
Tubercule de 3 gr.	0,16	0,46	0,347
— de 5 gr.	0,13	0,42	0,309
— de 36 gr.	0,08	0,66	0,121
— de 110 gr.	0,03	1,15	0,026

On voit immédiatement que le rapport $\frac{\text{Réducteur}}{\text{Saccharose}}$ présente de grandes analogies dans les deux plantes. COLIN conclut à propos de la Betterave : « Il existe donc constamment, dans la souche, une quantité appréciable de sucre cristallisable et désormais,

il est impossible d'invoquer l'absence de réducteur pour refuser à la racine tout rôle de polymérisation ». Nous n'avons pas étudié personnellement cette très intéressante question de physiologie végétale, mais les observations que nous rapportons semblent confirmer l'hypothèse de COLIN.

En résumé l'étude du tubercule de Céleri permet de fixer les points suivants. Le mannitol est une substance de réserve pour le Céleri. Il s'accumule dans la racine pendant la première année de la végétation. Il semble être produit par l'assimilation chlorophyllienne. Son rôle n'apparaît pas comme très important dans l'édification des tissus nouveaux de seconde année, et il n'est utilisé qu'à partir du moment où la plante n'a plus à sa disposition qu'une faible quantité de saccharose. Celui-ci s'accumule surtout dans le tubercule pendant l'hiver. Durant la seconde année, il disparaît progressivement. La floraison et la fructification n'augmentent pas la vitesse de son utilisation. Le réducteur est toujours très peu abondant, et il se peut très bien que sa présence témoigne du rôle de polymérisation de la racine.

V. Recherches expérimentales sur la formation et l'utilisation du mannitol.

A. *Action de la lumière sur la formation du polyol.* — Les observations que nous venons de faire permettent de poser un certain nombre d'hypothèses qu'il convient d'essayer de vérifier par l'expérience. En nous basant sur l'évolution du mannitol comparativement, dans les limbes, dans les pétioles et dans le tubercule nous avons été amené à penser que le polyol était formé dans les limbes aux dépens de l'assimilation chlorophyllienne.

Pour élucider ce point, nous avons fait l'expérience suivante. Le 27 juin, vers 17 heures, nous avons récolté 30 pieds de Céleri de première année et nous en avons fait trois lots aussi identiques que possible. Les racines des 30 Céleris sont sectionnées au collet. Ensemble elles pèsent 150 grammes. Elles sont fixées et analysées. Les valeurs trouvées pour le mannitol, le saccharose et le réducteur figurent dans les tableaux que nous

avons donnés plus haut. Les parties aériennes du premier lot (A) pèsent au total 132 grammes, celles du second (B), 130 grammes, celles du troisième (C), 128 grammes. Ces trois lots sont donc identiques à trois pour cent près.

Les feuilles du lot C sont fixées immédiatement, après que les limbes ont été détachés des pétioles. Une feuille entière est prise pour la mesure de la surface foliaire, comme nous l'avons exposé antérieurement.

Les feuilles du lot B sont placées sur de l'eau par l'intermédiaire de leurs pétioles. Elles sont ensuite portées à l'obscurité et recouvertes d'une cloche. L'aération est assurée. Les feuilles du lot A sont traitées de la même façon que les précédentes.

Au bout de 60 heures d'obscurité, les feuilles du lot B sont récoltées, et limbes et pétioles sont fixés séparément. A ce moment, les feuilles du lot A sont sorties de la chambre noire et placées à la lumière pendant une période de 12 heures, puis elles sont fixées dans les mêmes conditions que précédemment. De cette façon il est possible d'étudier les points suivants : disparition du mannitol à l'obscurité, formation à la lumière.

A la fin des expériences, les poids des feuilles n'ont pas sensiblement varié. On peut donc admettre que celles-ci n'ont pas souffert et se trouvent, autant qu'il est possible de l'obtenir dans une telle expérience, dans un bon état physiologique. Les résultats que nous donnons dans le tableau suivant sont rapportés à l'ensemble des organes fixés pour chaque lot, soit 10 plants.

		Feuilles témoins prises à la culture		Feuilles après 60 heures d'obscurité		Feuilles après 60 heures d'obscurité et 12 heures de lumière	
		Limbes	Pétioles	Limbes	Pétioles	Limbes	Pétioles
Mannitol	gr.	0,504	0,884	0,060	1,340	0,310	1,332
Réducteur	gr.	0,210	0,324	0,180	0,361	0,168	0,414
Saccharose	gr.	0,436	0,180	0,084	0,109	0,191	0,140

Influence de l'obscurité. — Mannitol. Dans les limbes, le polyol diminue à l'obscurité, mais, dans les pétioles, il augmente. Au total, en additionnant les nombres trouvés dans les deux organes, on retrouve la même quantité de substance.

$$0 \text{ gr. } 504 + 0 \text{ gr. } 884 = 1 \text{ gr. } 388$$

$$0 \text{ gr. } 060 + 1 \text{ gr. } 340 = 1 \text{ gr. } 400$$

A la précision des dosages près, ces deux nombres sont identiques. Donc les feuilles de Céleri de première année, n'utilisent pas immédiatement le mannitol quand on les met en état d'inanition carbonée.

Réducteur. La quantité de réducteur ne varie pas beaucoup, ce fait indique que l'inanition n'a pas été très poussée.

Saccharose. Ce corps diminue nettement et dans les limbes, et dans les pétioles. Sa quantité totale est passée de 616 milligrammes à 193. Le fait qu'il reste du saccharose en quantité notable explique que le réducteur n'a pas varié.

Influence de la lumière. — Mannitol. La quantité de polyol augmente considérablement après une exposition de 12 heures des feuilles à la lumière, elle passe de 60 à 310 milligrammes. Par contre celle contenue dans les pétioles est restée constante : 1.332 contre 1.340. Ceci prouve que 250 milligrammes de mannitol ont été formés à la lumière par les limbes.

Réducteur. Il ne subit pas de modifications importantes.

Saccharose. La quantité de saccharose augmente dans les limbes et les pétioles sans cependant atteindre les valeurs trouvées dans les feuilles prises dans les conditions naturelles.

Une autre expérience qui avait été faite le 19 juin, nous avait donné des résultats qui nous ont engagé à la reprendre et à la compléter. Nous la donnons à titre de vérification de la précédente. 20 Céleris sont déplantés vers 17 heures. Les racines sont sectionnées au collet et les groupes de feuilles sont rassemblés en deux lots de 10 bouquets foliaires qui pèsent l'un (A) 94 grammes et l'autre (B) 95 grammes. Les feuilles du lot A sont traitées immédiatement, les limbes sont séparés des pétioles et chacun des deux organes est fixé séparément. Les feuilles du lot B sont mises en rapport avec de l'eau par l'intermédiaire de leurs pétioles et portées à la chambre noire. Elles y sont

laissées pendant quatre jours. Au bout de ce temps, limbes et pétioles, après avoir été pesés, sont fixés. Le poids des organes en expérience n'a pas sensiblement varié.

Les résultats des analyses sont consignés dans le tableau suivant. Ils sont rapportés à la totalité des feuilles fixées.

	Feuilles témoins prises à la culture		Feuilles après quatre jours d'obscurité	
	Limbes	Pétioles	Limbes	Pétioles
Mannitol. gr.	0,364	0,440	0	0,809
Réducteur gr.	0,186	0,208	0,099	0,234
Saccharose gr.	0,462	0,102	0,040	0,124

Cette expérience de même que la précédente nous montre que le mannitol n'est pas utilisé par les limbes, ou par les pétioles à l'obscurité. La quantité totale de polyol, contenue dans le témoin est de 0 gr. 804 et après l'expérience on en retrouve 0 gr. 809. Mais, pour l'étude de l'influence de l'obscurité sur l'évolution biologique du mannitol, cette expérience est plus complète que la précédente car le temps d'inanition carbonée ayant été plus long, le saccharose a presque totalement disparu des limbes et le réducteur lui-même a diminué de moitié.

Le mannitol nous apparaît donc comme dérivant de l'assimilation chlorophyllienne au même titre que le saccharose. A la différence du sucre, le polyol n'est pas utilisé immédiatement à l'obscurité, mais il est évacué en nature dans les pétioles qui le délivrent en dernier ressort au tubercule.

B. *Utilisation du mannitol.* — Les expériences précédentes nous montrent que le mannitol n'est pas détruit par les limbes qui le forment et qu'il est mis en réserve dans le tubercule. L'étude de cet organe nous a fait voir que le taux du polyol pouvait être assez élevé, puisqu'à certains moments il atteint 2,6. Pendant l'hiver, alors que le poids du tubercule ne varie pas, la teneur en mannitol diminue : celui-ci disparaît donc réellement de la racine. S'agit-il d'une utilisation ou d'une

transformation de substances ? La question est difficile à résoudre. Au printemps, la quantité de polyol reste à peu près stable ; au début de l'été, elle diminue, et, à la fin de la végétation, il n'en reste pour ainsi dire plus dans le tubercule. En étudiant le saccharose, nous avons vu que la teneur en mannitol baissait au moment où il n'y avait plus que 1 p. 100 de sucre. Tout se passe donc comme si le sucre était une substance plus facilement utilisable, pour la plante, que l'alcool polyatomique. Nous nous sommes adressé à cette période de la végétation pour essayer de provoquer expérimentalement des modifications dans l'évolution des substances, qui soient susceptibles de nous renseigner sur l'utilisation du mannitol et sur les rapports de ce corps avec le saccharose.

Nous avons vu qu'à partir du 29 mars, une tige commence à se développer. C'est ce moment qui nous a semblé favorable pour faire l'expérience qui consiste à provoquer le développement des feuilles à l'obscurité et à suivre l'évolution des substances dans la racine. Le meilleur moyen, pour réaliser cette expérience, consiste à laisser en place les individus choisis et à les recouvrir d'un grand réservoir métallique étanche à la lumière. L'aération est assurée par deux tuyaux contournés, pour faire chicane de lumière, l'un passant sous le bord libre du réservoir enfoncé en terre et débouchant à l'intérieur, l'autre au sommet du récipient. La différence de température existant entre le haut et le bas de l'enceinte assure une ventilation très suffisante pour les trois *Céleris* utilisés.

L'expérience, commencée le 29 mars, a été interrompue le 30 mai par la prise de l'un des trois individus. Elle n'a pu être continuée : car les jours qui ont suivi cette date ont été très ensoleillés, et sous l'enceinte métallique, la température a monté exagérément et les feuilles ont séché et disparu. Mais à la date du 30 mai, le *Céleri* fixé présentait un développement comparable aux témoins végétant normalement en pleine terre. Une tige de 50 centimètres de hauteur, portant des feuilles étiolées, s'était développée. Un des deux autres individus restant était à peu près semblable. Le troisième était plus petit et moins bien venu.

Le 29 mars, un *Céleri* comparable à ceux qui étaient mis en

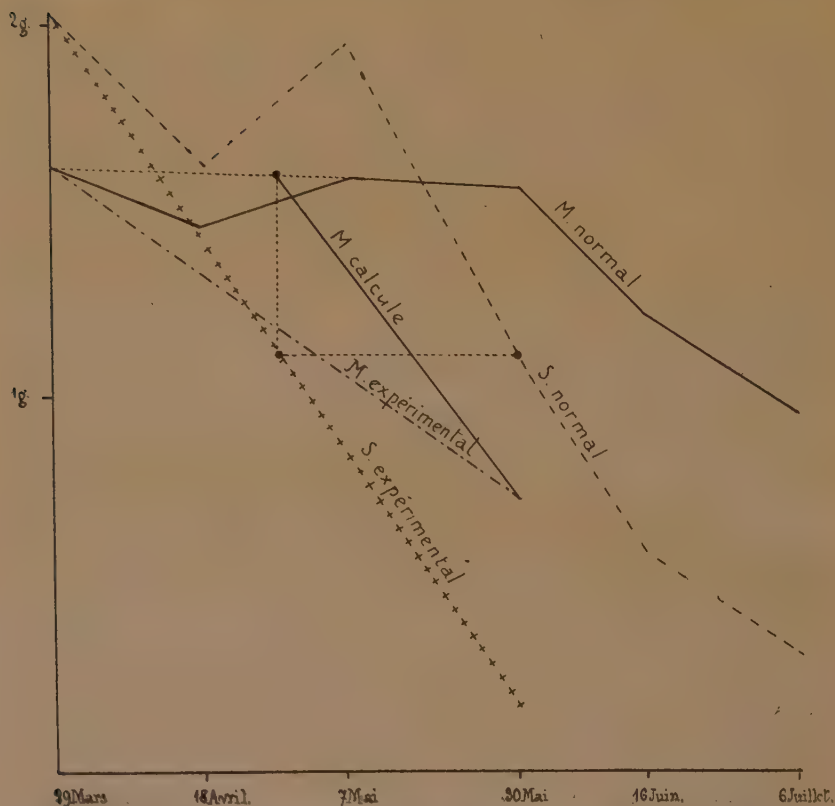
expérience a été fixé et analysé. Le 30 mai, un tubercule témoin est fixé en même temps que la racine correspondant au Céleri en expérience. De cette façon, on peut connaître la quantité de mannitol, de saccharose et de réducteur avant l'expérience, puis après développement des organes foliaires à l'obscurité et enfin après formation de ces mêmes organes à la lumière dans les conditions naturelles.

Les données des analyses sont figurées dans le tableau suivant. Les résultats sont rapportés à 100 grammes de poids frais.

	Tubercule du 29 mars en place	Tubercules du 30 mai	
		en place	en expérience
Mannitol. gr.	1,618	1,548	0,738
Saccharose gr.	2,014	1,081	0,180
Réducteur gr.	0,038	0,039	0

En place, la quantité de mannitol n'a pas varié du 29 mars au 30 mai. D'ailleurs la portion du graphique correspondant à cette période, que l'on peut voir ci-dessous, montre bien ce phénomène. Le saccharose est moitié moins abondant. Le réducteur est invariable. Mais dans le tubercule en expérience, qui a développé une tige et des feuilles ne subvenant pas par elles-mêmes à leur nutrition carbonée, puisque l'assimilation chlorophyllienne n'existe pas, les nombres trouvés sont très différents. Par rapport au témoin pris à la même date, le mannitol a diminué de moitié, la teneur en saccharose est tombée au dixième de sa valeur environ, et le réducteur a totalement disparu. Le graphique 15 traduit l'évolution de ces substances pendant cette période. En examinant la portion du graphique qui va du 30 mai au 6 juillet, on comprend l'ordre qui préside à l'utilisation des substances de réserve. Au 30 mai, le mannitol n'est pas attaqué, le saccharose représente 1,1 p. 100 du poids frais du tubercule. Au 16 juin, le mannitol diminue, la teneur en saccharose n'est plus que de 0,58 p. 100. Au 6 juillet le polyol continue à disparaître, il n'y a plus que

0,3 p. 100 de saccharose. Déjà cette simple observation montre que le saccharose est utilisé en premier lieu et que le polyol ne l'est qu'ultérieurement quand la teneur du sucre a fortement baissé. Il semble même que c'est à partir du moment où le tubercule ne contient plus que 1,1 p. 100 de saccharose que la disparition du mannitol commence. Or en supposant que, dans



Graphique 15. — Evolution du mannitol (M. normal) et du saccharose (S. normal) dans le tubercule de Céleri se développant dans les conditions naturelles. Evolution du mannitol (M. expérimental) et du saccharose (S. expérimental) dans un tubercule de Céleri végétant à l'obscurité. En tenant compte de ce fait que normalement le mannitol est utilisé quand la teneur en saccharose est de 1,1 p. 100, on peut, dans la racine maintenue à l'obscurité, retrouver le moment où cette valeur était atteinte pour le sucre et faire débiter à ce moment la diminution du mannitol qui aboutit au nombre trouvé le 30 mai (M. calculé).

notre expérience, le graphique d'utilisation du saccharose soit une droite — ce qui semble bien être indiqué par les autres analyses — on peut chercher à savoir à quelle date a commencé l'utilisation du mannitol en prenant comme seuil le chiffre trouvé précédemment de 1,1 pour le sucre. Cette date est celle du 27 avril, comprise entre les analyses du 18 avril et du 7 mai. A ce moment, la teneur en mannitol d'un tubercule moyen, abstraction faite des différences individuelles, est d'environ 1 gr. 36. Puisqu'à ce moment le taux du saccharose est de 1,1, d'après ce que nous avons vu précédemment, le mannitol doit commencer à disparaître. Joignons donc ce point du 27 avril à celui qui a été obtenu par l'analyse du 30 mai dans le tubercule en expérience. Nous obtenons une droite parallèle à celle qui représente l'évolution du saccharose dans la même racine. En d'autres termes, il semble bien qu'à partir du moment où il n'y a plus que 1 p. 100 de saccharose dans le tubercule, le mannitol est attaqué, et qu'il est utilisé sensiblement avec la même vitesse que le sucre. Nous avons vu que, dans le *Sterigmatocystis*, se produit un phénomène analogue. Quand on cultive la moisissure sur un mélange de mannitol et de saccharose, le polyol est utilisé concurremment avec le sucre et avec la même intensité.

Le mannitol qui disparaît de la racine ne se retrouve pas dans les feuilles étiolées, car une analyse faite dans celles-ci n'a pas permis de l'y déceler. Dans les conditions naturelles, et à tout moment de la végétation, on trouve du mannitol et du saccharose dans les feuilles. Nous avons vu qu'au cours de la première année, ces substances sont évacuées et mises en réserve dans la racine. Pendant la seconde année, elles sont vraisemblablement utilisées sur place pour la formation des fleurs et des fruits. Une analyse faite sur 100 grammes de graines de Céleri, récoltées depuis six mois environ, a été négative au point de vue du polyol.

On peut donc comprendre de la façon suivante l'évolution du mannitol au cours de la seconde année de végétation du Céleri : dans le tubercule, le polyol disparaît, à partir du moment où le saccharose est en faible quantité. Il ne semble pas qu'il prenne une grande part à l'édification de la tige et des feuil-

les. Celles-ci fabriquent elles-mêmes des réserves qu'elles utilisent immédiatement, économisant ainsi les réserves du tubercule. A partir du moment où des ombelles très nombreuses se développent — on peut dire qu'il y en a une à l'aisselle de chaque feuille — les organes chlorophylliens deviennent insuffisants à fournir des sucres et il est fait appel à ceux du tubercule qui se vide progressivement et qui ne contient plus du tout de mannitol ni de saccharose au moment de la maturité des fruits.

CONCLUSIONS.

Au cours de ce mémoire, nous avons été amené à envisager un certain nombre de problèmes. Les recherches entreprises pour les résoudre ont permis de proposer des solutions qui sont indiquées dans les différents chapitres. Toutefois il nous semble indispensable de rappeler, sous forme de conclusions, celles qui ont directement trait à notre sujet. Nous les diviserons en trois parties, celles qui s'adressent au *Sterigmatocystis*, celles qui correspondent au Céleri, et enfin, les conclusions générales valables pour les deux plantes.

1. Le **mannitol** existe toujours dans le *Sterigmatocystis* à un moment donné de son évolution, quelles que soient les conditions de la culture.

2. Il se forme au début de la végétation, dans les 48 premières heures, ce qui correspond au moment où le liquide est riche en sucre.

3. Après cette période d'augmentation rapide, il disparaît du champignon. Des phénomènes physiologiques importants comme la sporulation et l'autolyse ne semblent pas avoir d'influence sur la vitesse de son utilisation.

4. Il constitue un excellent aliment pour le *Sterigmatocystis* puisque c'est sur un milieu au mannitol que le poids du mycélium atteint son maximum et que les réserves sont les plus abondantes.

5. La germination des conidies sur un liquide contenant le polyol est difficile. Au contraire elle est rapide en présence de sucre interverti. Sur un mélange des deux corps on voit que la germination est normale et que le saccharose est utilisé de préférence par les jeunes filaments. Dès que ceux-ci ont atteint un certain développement et que la teneur en saccharose du liquide a diminué, le mannitol disparaît à son tour et avec la

même vitesse que le sucre. Donc le polyol, aliment de peu de valeur pour les conidies, devient une source de carbone comparable au saccharose pour un mycélium adulte.

6. Le **tréhalose** existe à côté du mannitol, dans le *Sterigmatocystis*. Il se forme indépendamment de ce corps. Normalement la réaction acide du liquide de culture gêne sa formation, mais, quand le milieu est maintenu à la neutralité, il est produit dès le début de la végétation.

7. A la différence du polyol, il continue à s'accumuler alors que le liquide est épuisé. A ce moment, il doit correspondre à un produit de transformation du mycélium.

8. Il est utilisé à la fin de la végétation, pendant l'autolyse. Le tréhalose n'est donc pas une substance de déchet qui, dans ces conditions, augmenterait indéfiniment.

9. Chez le Céleri, le **mannitol** est formé dans le limbe des feuilles à la lumière. C'est donc un produit de l'assimilation chlorophyllienne.

10. Les feuilles ne l'utilisent pas, elles l'évacuent dans les pétioles où il se met momentanément en réserve.

11. Pendant la première année, il s'accumule dans le tubercule. L'augmentation de la teneur en polyol de la racine est régulière tant que le poids frais de l'organe augmente rapidement, c'est-à-dire au début de la végétation.

12. Il diminue pendant l'hiver dans la racine alors que la quantité de saccharose s'accroît.

13. Au printemps, pendant la formation des tissus de seconde année, sa quantité reste stable. Il ne prend donc pas une part active à leur édification. Cependant, en fin de seconde année, il disparaît à son tour : le polyol n'est donc pas une substance de déchet.

14. Le **saccharose** se forme indépendamment du mannitol. Il n'y a pas de rapport apparent entre ces deux substances.

15. Le sucre continue à augmenter dans la racine alors que l'assimilation chlorophyllienne est presque supprimée, pendant l'hiver. Il est donc produit à ce moment aux dépens d'autres substances contenues dans le tubercule.

16. Au début de la seconde année, il est utilisé et son évolution reste toujours indépendante de celle du mannitol.

Le rappel des conclusions auxquelles nous sommes arrivé pour le *Sterigmatocystis* et le Céleri, nous permet de faire un certain nombre de rapprochements entre l'évolution des substances que nous avons étudiées et qui sont contenues dans les deux plantes.

17. Au point de vue de la Physiologie générale, le mannitol se forme dans les mêmes conditions chez le *Sterigmatocystis* et chez le Céleri : dans un cas, il s'accumule tant que le liquide de culture est très riche en sucre ; dans l'autre, il se met en réserve quand l'assimilation chlorophyllienne présente sa plus grande activité, au début de la première année.

18. Le tréhalose et le saccharose sont tous deux également indépendants du mannitol. Il y a un autre point commun dans leur évolution, c'est la possibilité de leur formation, d'une part, dans un liquide ne contenant plus de sucre, et, d'autre part, pendant l'hiver, en l'absence d'assimilation chlorophyllienne. Dans un cas comme dans l'autre, les deux corps proviennent de substances existant dans le mycélium ou dans le tubercule.

19. A côté de ces analogies, il nous faut également signaler des différences : le mannitol est utilisé de préférence au tréhalose dans le cas du *Sterigmatocystis* et il disparaît après le saccharose chez le Céleri.

20. Le mannitol se comporte donc comme une substance de réserve évoluant parallèlement et indépendamment des autres sucres que nous avons étudiés.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ABDERHALDEN (E.). — Lehrbuch der Physiologischen Chemie. Urban et Schwarzenberg. Berlin, Wien, 1909, 66.
2. BADREAU (J.). — Dosage de la mannite par les procédés polarimétriques. *Th. Dipl. Pharm. sup.* Paris, 1921.
3. BOUCHARDAT (G.). — Sur le pouvoir rotatoire spécifique de la mannite. *C. R. Ac. Sc.*, 1875, 80, 120.
4. BOURQUELOT (E.). — Recherches sur les matières sucrées de quelques espèces de champignons. *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 1889, (5), 19, 369.
5. — Les Hydrates de Carbone chez les champignons. *Bull. de la Soc. Myc. de France*, 1889, 5, 132.
6. — Sur la présence et la disparition du tréhalose dans les champignons. *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 1890, (5), 22, 413.
7. — Sur la nature et les proportions des matières sucrées contenues dans les champignons à différents âges. *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 1890, (5), 22, 497.
8. — Sur la répartition des matières sucrées dans le Cèpe comestible (*Boletus edulis* Bull.) et le Cèpe orangé (*Boletus aurantiacus* Bull.). *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 1891, (5), 24, 521.
9. — Sur un artifice facilitant la recherche du tréhalose dans les champignons. *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 1891, (5), 24, 524.
10. — Sur la production du tréhalose par une moisissure cultivée en milieu artificiel. *Ass. franç. C. R.* 1892, 180.
11. — Sur l'époque de l'apparition du tréhalose dans les champignons. *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 1893, (5), 27, 113.
12. BOURQUELOT (F.) et HÉRISSEY (H.). — Sur la tréhalase, sa présence générale dans les champignons. *C. R. Ac. Sc.*, 1904, 139, 874.
13. BRACONNOT. — Recherches analytiques sur la nature des champignons. *Ann. de Chimie*, 1811, (1), 79, 263.
14. BRAECKE (Mlle M.). — Sur la présence d'aucubine et de mannite dans les tiges foliées de *Rhinanthus Crista-Galli* L. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, 5, 258.
15. CHARPENTIER. — Sur les pectines retirées du Céleri-rave, des tubercules de *Stachys tuberifera*, et de l'écorce d'orange amère. Application du procédé biochimique de caractérisation du galactose à l'étude de la composition de ces pectines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, 6, 142.
16. COLIN (H.). — Le saccharose dans la Betterave. Formation et disparition. *Rev. Gén. de Bot.*, 1916, 28, 289.
17. — Hydrolyse de quelques polysaccharides par le *Botrytis cinerea*. *Ann. des Sc. nat. Bot.*, 191, (9), 1.
18. COUPIN (H.). — Sur l'assimilation des alcools et des aldéhydes par le *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Ac. Sc.*, 1904, 138, 389.

19. CZAPECK. — *Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie (Hofmeister)*, 1902, 3, 62.
20. GERBER. — Etude de la transformation des substances sucrées dans les olives. *C. R. Ac. Sc.*, 1897, 125, 658.
21. HÜBNER et VOGEL. — Ueber den Mannazucker den Sellerie-Würzel. *Repertorium für die Pharmacie*, 1823, 15, 276.
22. JÉGOU. — Contribution à l'étude des vins mannités et dosage de la mannite. *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 28, 103.
23. LIEBIG et PELOUZE. — Notices diverses. Mannite. *Ann. de Chimie et de Physique*, 1836, (2), 58, 138.
24. DE LUCA (M. S.). — Recherches sur la formation de la matière grasse dans les olives. *C. R. Ac. Sc.*, 1864, 53, 380.
25. — Recherches sur la matière grasse dans les olives. *C. R. Ac. Sc.*, 1862, 55, 506.
26. MAQUENNE (L.). — Les sucres et leurs principaux dérivés. Gauthier-Villars. Paris, 1900.
27. MEUNIER (J.). — Sur la combinaison des anhydrides de la mannite avec l'essence d'amandes amères. *C. R. Ac. Sc.*, 1888, 106, 1425.
28. — Sur quelques composés de la mannite. *C. R. Ac. Sc.*, 1888, 106, 1732.
29. MITSCHERLICH. — Ueber die Mykose, den Zucker des Mutterkorns. *J. f. prakt. Chem.*, 1858, 73, 65.
30. MOLISCH (Dr H.). — *Mikrochemie der Pflanze*. Jena. Fischer, 1921.
31. MOLLIARD (M.). — Nutrition de la plante. Formation des substances ternaires, fasc. II, 14. *Encyclopédie scientifique*. Gaston Doin. Paris.
32. — Nutrition de la plante. Utilisation des substances ternaires, fasc. III, 103. *Encyclopédie scientifique*. Gaston Doin. Paris.
33. — Manière dont se comporte le *Sterigmatocystis nigra* vis-à-vis de diverses substances sucrées dans les milieux faiblement minéralisés. *C. R. Ac. Sc.*, 1924, 178, 161.
34. — Signification physiologique de l'acide oxalique. *C. R. Soc. Biol.*, 1919, 82, 35.
35. MÜNTZ. — Sur la matière sucrée contenue dans les champignons. *C. R. Ac. Sc.*, 1873, 76, 649.
36. — De la matière sucrée contenue dans les champignons. *C. R. Ac. Sc.*, 1874, 79, 1182.
37. — Recherches sur les fonctions des champignons. *Ann. de Chimie et de Physique*, 1876, (5), 8, 56.
38. OBATON (F.). — L'évolution du Tréhalose chez le *Sterigmatocystis nigra* Van Tieghem. *C. R. Soc. Biologie*, 1925, 93, 304.
- Origine et évolution du mannitol chez les végétaux. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, 188, 77.
39. PAYEN. — Note sur la mannite du Céleri rave. *Ann. de Chimie et de Physique*, 1833, (2), 55, 219.
40. PROUST. — Sur le sucre de raisin. *Ann. de Chimie*, 1806, (1), 57, 131.
41. RAULIN. — Etudes chimiques sur la végétation. *Thèse de Sciences*. Paris, 1870.
42. VAUQUELIN. — Expériences sur les champignons. *Ann. de Chimie*, 1813, (1), 85, 5.
43. VIGNON. — Du pouvoir rotatoire de la mannite. *C. R. Ac. Sc.*, 1873, 77, 1191.

44. — De l'action des systèmes ternaires définis, de borax et d'eau, sur la lumière polarisée. *C. R. Ac. Sc.*, 1874, 78, 148.
45. VOGEL. — De l'existence de la mannite dans les feuilles de Céleri (*Apium graveolens*). *Journ. de Pharm.*, 1823, 9, 418.
46. WEFERS BETTINK. — Réaction de la mannite, d'après *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 1902, 15, 584 in *Ned. Tijdschr. Pharm.*, 1901, 13, 321.
-

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Zoologie. — Les insectes producteurs de manne.

Géologie. — Géothermie.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 8 janvier 1929.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER .

Le Recteur de l'Académie de Paris.

S. CHARLÉTY.

